

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

TARTU ÜLIKOOLI MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Evelin Rammul

**NickFect51 analoogid kui potentsiaalsed tuumori-
spetsiifilised aktiveeritavad ravimikandjad**

Magistritöö

Juhendajad PhD Kaido Kurrikoff

PhD Piret Arukuusk

TARTU 2015

SISUKORD

| | |
|--|----|
| SISUKORD | 2 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1 KIRJANDUSLIK ÜLEVAADE | 8 |
| 1.1 Rakku sisenevad peptiidid | 8 |
| 1.2 RSP-de rakkudesse sisenemise mehhanismid..... | 9 |
| 1.2.1 Endotsütoos | 10 |
| 1.2.2 Translokatsioon | 11 |
| 1.3 Aktiveeritavad ravimikandjad..... | 11 |
| 1.3.1 Aktiveeritavad rakku sisenevad peptiidid..... | 12 |
| 1.4 Transportaanist NF51-ni | 16 |
| 1.5 Maatriksi metalloproteaasid..... | 17 |
| 2 EKSPERIMENTAALNE OSA | 19 |
| 2.1 Töö eesmärgid..... | 19 |
| 2.2 Materjalid ja meetodika | 19 |
| 2.2.1 Peptiidide süntees | 19 |
| 2.2.1.1 Peptiidide sünteesi meetodid..... | 19 |
| 2.2.1.2 Peptiidide puhastamine RP-HPLC-ga..... | 20 |
| 2.2.1.3 Sünteesitud peptiidide analüüs MALDI-TOF meetodiga | 20 |
| 2.2.1.4 Sünteesitud peptiidide analüüs UPLC meetodiga | 21 |
| 2.2.2 Katsed rakkudega | 21 |
| 2.2.2.1 Rakkude kultiveerimine | 21 |
| 2.2.2.2 Konfokaalmikroskoopia | 21 |
| 2.2.2.3 Läbivoolutsütomeetria..... | 22 |
| 2.2.3 Andmeanalüüs | 22 |
| 3 TULEMUSED | 23 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.1 | NF51 analoogide süntees | 23 |
| 3.2 | MMP2 ensüümi mõju hindamine disainitud peptiididele UPLC meetodiga | 24 |
| 3.3 | FAM-i fluorestsents intensiivsuse hindamine, kasutades konfokaalmikroskoopiat .. | 25 |
| 3.4 | FAM-i fluorestsents intensiivsuse analüüs, kasutades läbivoolutsütomeetriat | 30 |
| 4 | ARUTELU | 31 |
| 5 | KOKKUVÕTE | 35 |
| 6 | SUMMARY | 37 |
| | KASUTATUD KIRJANDUS | 39 |
| | KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 42 |
| | LISAD | 43 |
| | LISA 1 | 43 |
| | LISA 2 | 43 |
| | LISA 3 | 44 |
| | LISA 4 | 45 |
| | TÄNUSÕNAD | 46 |
| | LIHTLITSENTS | 47 |

KASUTATUD LÜHENDID

| | |
|--------------|--|
| AcN | atseetonitriil |
| AH | aminohape |
| CHCA | α -tsüaano-4-hüdroksükaneel hape |
| CHO | hiina hamstri munasarjarakud (<i>Chinese hamster ovary cells</i>) |
| DCM | diklorometaan |
| DIC | N,N'-diisopropüülkarbodiimid |
| DIEA | N,N-diisopropüületüülamiin |
| DMF | dimetüülformamiid |
| FACS | fluorestsentsi poolt aktiveeritav rakkude sorteerija (<i>Fluorescence activated cell sorter</i>) |
| FAM | 6-karboksüfluorestseiin |
| FBS | veise looteseerum (<i>Fetal bovine serum</i>) |
| Fmoc | 9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm |
| FRET | fluorestsentsi resonantsenergia ülekanne (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>) |
| Ham`s | Ham`s koekultuuri sööde |
| HBTU | N-[1H-Bensotriasool-1-üül)(dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat |
| HIV | inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>) |
| HOBt | 1-hüdroksübensotriasool |
| MALDI-TOF MS | maatriks abistatud laserdesorptsioonionisatsioon-lennuaja massi-spektromeetria (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>) |

| | |
|---------------|---|
| MMP2 | Maatriksi metalloproteaas 2 |
| mQ | deioniseeritud vesi |
| Mtt | N ⁻ -metüültritüül kaitserühm |
| NF51 | NickFect51 |
| PBS | fosfaat-puhverdatud soolalahus (<i>Phosphate buffered saline</i>) |
| RP-HPLC | pöördfaasi-vedelikkromatograafia (<i>Reversed phase High-performance liquid chromatography</i>) |
| RSP | rakku sisenev peptiid (<i>cell penetrating peptide</i>) |
| <i>Shield</i> | katioonset peptiidset järjestust inhibeerv anioonne peptiidne järjestus |
| siRNA | väike interfereeriv RNA (<i>small interfering RNA</i>) |
| SKO | splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid (<i>splice correction oligonucleotide</i>) |
| TIS | triisopropüülsilaan |
| TFA | trifluoroäädikhape |
| TP10 | Transportaan10 |
| UPLC | ülikõrgsurve vedelikukromatograafia (<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>) |

SISSEJUHATUS

Terves organismis on rakkude kasv ja areng rangelt reguleeritud pidevalt toimuvate stimuleerivate ja pidurdavate protsessidega, mis tagavad organismi normaalse talitluse. Selle range regulatsiooni kadumine võib viia organismi düsfunktsioonini, rakkude kontrollimatu kasvu ning ka vähi tekkeni. Tänapäeval peetakse arenenud riikide elanikkonna seas vähki üheks suurimaks üldise suremuse põhjustajaks. Vähi heterogeense olemuse tõttu on selle vastaste ravimite ning ravimeetodite väljatöötamine keeruline ning pikaajaline protsess. Vähiravis kasutatakse mitmeid ravimeid ja ravimeetodeid, aga endiselt püsib vajadus uute ja tõhusamate terapeutikumide järele.

Vähiravi jaguneb kolme klassi. Esiteks kirurgiline sekkumine, mille käigus teostatakse lõikus ning eemaldatakse mehhaaniliselt visuaalselt eristatav kahjustunud kude. Kuigi tänapäeval on vähi eemaldamiseks mõeldud kirurgilised instrumendid ja masinad võrreldes varasemaga kordades arenenumad, ei võimalda nad tagada täielikku vähirakkude eemaldamist organismist. Sellest tulenevalt on operatsiooni ajal lõplik otsus teha kirurgil, kes otsustab kui palju ja millises mahu ta kasvajat eemaldab. See ei pruugi tagada kõikide vähirakkude eemaldamist ning enamikel juhtudel hakkavad vähirakud taas progresseeruma. Teiseks klassiks on kiiritusravi ehk radioterapia. See on lokaalne sekkumine, mille käigus rakendatakse kahjustunud alale ioniseerivat kiirgust, eesmärgiga kahjustada ja hävitada kiiritatavas piirkonnas kasvajakarakkude DNA-d. Kasvajakolde allikat ei ole võimalik alati kindlaks teha, seetõttu ei saa ka kiiritusravi korral välistada vähirakkude edasist kasvamist ning arenemist. Viimaseks meetodiks on kemoterapia ehk keemiaravi. Seda peetakse vähiga võitluses kõige perspektiivikamaks ja on nimetatud meetoditest ainsana võimeline jõudma kehas kõikide rakkudeni, nende tsütoplasmasse ja tuuma ning avaldama seal üldist terapeutilist mõju. Vähiravi efektiivsuse suurendamiseks ja kõrvalmõjude vähendamiseks on vajalik leida ja arendada uusi, efektiivsemaid, vähemtoksilisi ja suurema spetsiifilisusega kemoterapia ravimeid.

Kuna kemoterapeutikumidel on omadus siseneda organismis kõikidesse rakkudesse, jõuab toksiline vähirakke hävitav mõju mingil määral ka tervete kudedeni. Varasemalt on põhieesmärgiks olnud efektiivsemate keemiaravimite väljatöötamine, aga viimastel aastatel on intensiivistunud lähenemine, kus ravimi molekul seotakse eraldi maatriksisse, mida nimetatakse ravimikandjaks. Enamasti ei oma ravimikandja ise vähivastast bioefekti, vaid mõjutab ravimi farmakokineetikat (ravimi vabastamise mehhanismi), ravimi biodistributsiooni, *in vivo* stabiilsust ning suurendab ravimi spetsiifilisust vähirakkude suhtes. Üheks aktiveeritava ravimikandja näiteks on praegu vähiravis kasutatav ravim *Doxil*. See koosneb doksorubitsiinist,

mis kuulub vähivastaste antratsükliin antibiootikumide rühma ning teda ümbritsevast PEG-liposoomist (kunstlikult valmistatud sfääriline lipiidne vesiikul). Antud osake on keha immuunsüsteemi eest kaitstud ning see võimaldab ravimimolekulil vereringes kauem ringelda. *Doxil* koguneb eelistatult vähkkasvajaga seotud kudedesse. Jõudes kasvajakudede ligidusse vabaneb kapseldatud doksorubitsiin pegüleeritud liposoomist ning avaldab oma toimet vähirakkudele. *Doxil*-i kasutatakse rinnavähi, munasarjavähi, luuüdivähi ja teiste vähiliikide raviks (UK, 2015).

Liposoomidele lisaks on ka teisi transpordivektoreid. Nüüdseks on paarkümmend aastat tuntud peptiidide klass, rakku sisenevad peptiidid (RSP-d). Need kuuluvad mitteviruslike transpordivektorite hulka. Lisaks omadusele iseseisvalt rakku penetreeruda ja vähesemale tsütotoksilisusele, iseloomustatakse RSP-sid kui häid transpordivektoreid, mis suudavad rakkudesse toimetada erinevas suuruses lastmolekule: nukleiinhappeid, oligonukleotide, peptiidide, valke, nanopartikleid jne (Madani et al., 2011). RPS-del on suur potentsiaal olla edukaks aktiveeritavaks ravimikandjaks. Magistritöö eesmärgiks on arendada ja testida RSP-del põhinevat aktiveeritavat ravimikandjat, mis oleks pikemas perspektiivis võimeline kemoterapeutikume spetsiifiliselt vähikoosse transportima.

Antud magistritöö eesmärkideks on:

1. Jälgida, kuidas toimib lastmolekuli (fluorestseeruva märgise) rakku transport valituks osutunud, varem väljatöötatud RSP-ga (NF51).
2. Disainida erinevad aktiveeritavad RSP analoogid, mis sisaldavad lisaks RSP järjestusele inaktiveerivat domeeni ning vähispetsiifilist aktiveerivat domeeni.
3. Sünteesida Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi meetodiga disainitud aktiveeritavad peptiidid.
4. Valideerida rakukultuuris inaktiveeriva domeeni mõju.
5. Valideerida vähispetsiifilise maatriksi metalloproteinaasi (MMP2) aktiveerivat toimet fluorestseeruva märgise rakku transpordil RSP-ga.

Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi geenitehnoloogia õppekava raames, eksperimentaalne osa on läbi viidud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis molekulaarse biotehnoloogia laboris.

1 KIRJANDUSLIK ÜLEVAADE

1.1 Rakku sisenevad peptiidid

Bioaktiivsete ainete rakku transportimisel on üheks paljulubavaks meetodiks rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) (Mäe and Langel, 2006). RSP-deks klassifitseeritakse 5-30 aminohappe pikkused katioonsed ja/või amfipaatset peptiidsed ühendid, mis suudavad rakke kahjustamata neisse siseneda. RSP-de abil saab transportida nendega kovalentselt või mitte-kovalentselt seotud erinevaid lastmolekule, mis iseseisvalt rakkudesse siseneda ei suuda: nukleiinhappeid, peptiide, proteiine, liposome, nanopartikleid jne (Dietz and Bähr, 2004). RSP-de eeliseks on see, et peptiidide poolt rakku toimetatud ühendid säilitavad bioloogilise aktiivsuse, tehes neist paljulubava vektorsüsteemi, mida saab potentsiaalselt kasutada nii geeniteraapias kui ka ravimite transpordiks.

Esmakordne kirjeldus RSP-dest pärineb aastast 1988, mil kaks uurimisgruppi näitasid inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV- *Human immunodeficiency virus*) transaktivatsiooni valgu domeenist eraldatud Tat-peptiidi võimet läbida *in vitro* tingimustes biomembraani ning jõuda rakutuumas (Green and Loewenstein, 1988)(Frankel and Pabo, 1988). 1991. aastal näidati äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) valgu – 60 aminohappe pikkuse *Antennapedia* homeodomääni võimet läbida rakumembraani näiliselt endotsütoosist sõltumatult (Joliot et al., 1991). Hiljem viis see 16-aminohappelise peptiidi – penetratiini (RQIKIYFQNRMKWKK) avastamiseni (Derossi et al., 1994). Penetratiini avastamist peetakse ühtlasi ka RSP-de, kui eraldiseisva teadusharu alguseks. Tänapäevaks on erinevate RSP-de hulk kasvanud kordades ning neile iseloomulikke omadusi on pidevalt täiustatud, et muuta neid veelgi efektiivsemaks.

RSP-sid on võimalik klassifitseerida erinevate kriteeriumite põhjal. Üheks võimaluseks on RSP-d jagada aminohappelise järjestuse põhjal kolme suurde klassi: katioonsed, amfipaatset ja hüdrofoobsed (Milletti, 2012a).

Katioonsed peptiidid koosnevad positiivselt laetud aminohapetest, milleks on enamasti lüsiin ja arginiin. Esimene avastatud RSP (HIV-1 Tat valgust saadud peptiid, RKKRRQRRR) kuulub katioonsete peptiidide hulka (Green and Loewenstein, 1988). Uuringud on näidanud, et seda tüüpi RSP-del on efektiivseks rakku sisenemiseks vaja minimaalselt kaheksa positiivse laenguga aminohapet (nt. oktaarginiin) (Futaki et al., 2001). Katioonsed peptiidid on kõige lühemad RSP-d.

Amfipaatsed RSP-d jagunevad primaarseteks amfipaatsedeks RSP-deks ja sekundaarseteks amfipaatsedeks RSP-deks. Primaarsete amfipaatsede peptiidide primaarstruktuuris on hästi eristunud katioonsed ja hüdrofoobsed domeenid ning interaktsioonid lipiididega on peamiselt hüdrofoobsed. Sekundaarsete amfipaatsede RSP-de primaarstruktuuris on olemas hüdrofiilsed ja hüdrofoobsed domeenid, kuid nende amfipaatsus avaldub alles membraani pinnamolekulidega seostumise ja sekundaarstruktuuride tekkimise järel (Di Pisa et al., 2015). Teatud RSP-de puhul on näidatud, et membraaniga seostudes tekkival α -heeliksi sekundaarstruktuuril esinevad heeliksi ühes pooles tugevalt hüdrofoobsed aminohapped, samal ajal kui teisel küljel paigutuvad hüdrofiilsed aminohapped.

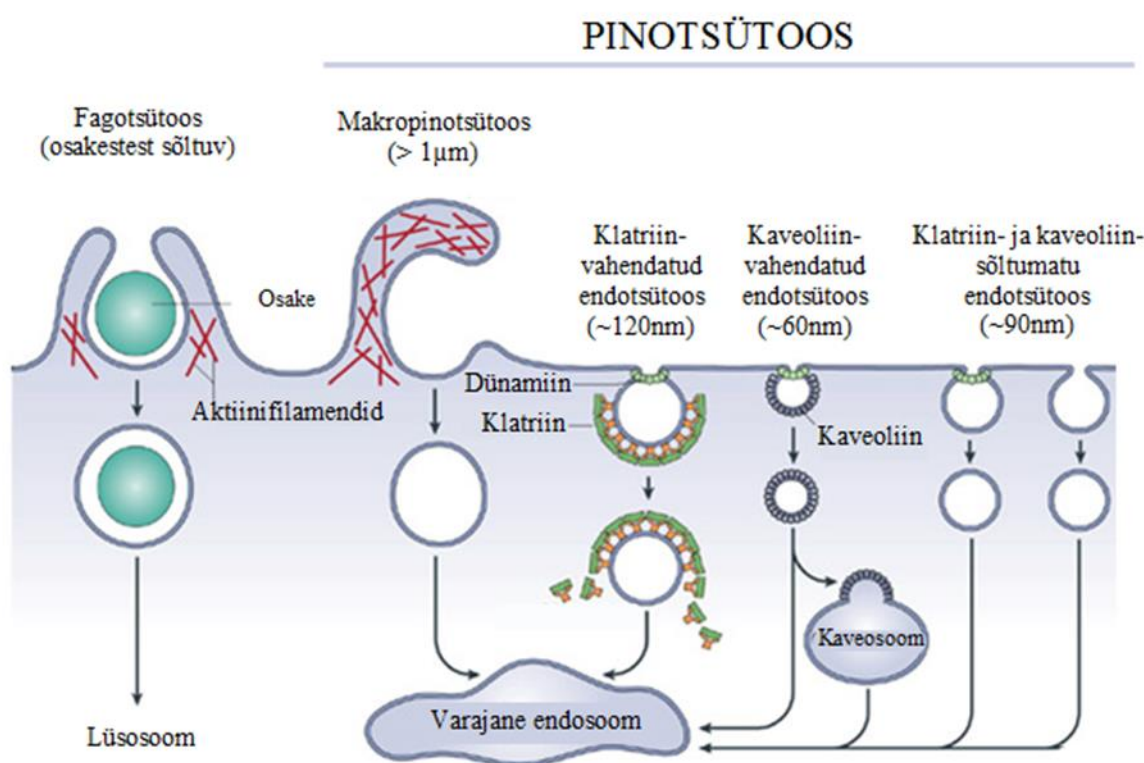
Hüdrofoobseteks peptiidideks klassifitseeritakse peptiidised järjestused, mis sisaldavad valdavalt mittepolaarseid aminohappeid, millel on madal negatiivne üldlaeng või mis sisaldavad rakku sisenemiseks olulisi hüdrofoobseid aminohappeid. Hüdrofoobseid peptiide on katioonsete või amfipaatsede peptiididega võrreldes kirjeldatud vähe (Milletti, 2012b).

1.2 RSP-de rakkudesse sisenemise mehhanismid

Viimastel aastatel on RSP-de hulk hüppeliselt kasvanud. Neile kõigile on iseloomulik see, et nad suudavad läbida rakku ümbritseva membraani ning vahendada rakku transporti erinevatele biomolekulidele, mis iseseisvalt rakku ei sisene. Uute efektiivsemate RSP-de optimeerimiseks või olemasolevate peptiidide omaduste parandamiseks, on oluline teada nende rakkusisenemise mehhanisme. Tänapäeval on enamlevinud arusaam, et RSP-d sisenevad rakkudesse kahel moel: otseselt läbi rakumembraani translokeerudes või energiast sõltuvaid endotsütoosi radu kasutades. RSP-de rakkudesse sisenemise tee sõltub mitmetest teguritest: konkreetsest RSP-st ja tema kontsentratsioonist, kasutatavatest rakkudest ja rakkude membraani lipiidsest koostisest, transporditava molekuli omadustest ja lasti ning RSP-de sidumismeetodist, keskkonna temperatuurist, jne (Morris et al., 2008). Üheks suurimaks erinevuseks endotsütoosi ja translokatsiooni vahel on see, et otsese penetreerumise puhul satub peptiid koos lastmolekuliga otse tsütoplasmasse, olles valmis täitma oma eesmärgi. Endotsütoosi radade kasutamise probleemiks peetakse molekulide kinni jäämist moodustunud vesiikulitesse, milledest mittevabanemine viib partikli rakust väljaheitmiseni või lüsoosoomides lagundamiseni. RSP-de efektiivsema endosoomidest vabastamise tehnoloogia leidmine on liigitatud üheks eraldiseisvaks uurimissuunaks RSP-de alal (Erazo-Oliveras et al., 2012).

1.2.1 Endotsütoos

Endotsütoos on transpordiviis, millega rakk saab membraani sissesopistumise abil väliskeskkonnast pärit makromolekulid ja mittelahustuvad ained rakku tuua. Endotsütoos on oluline raku normaalseks funktsiooniks, osaledes mitmetes elutegevuseks vajalikes protsessides nagu ainevahetuse regulatsioon, rakuareng, rakkude vaheline signalisatsioon, immuunreaktsioonid jne (Conner and Schmid, 2003). On täheldatud, et lastmolekuliga seotud RSP-d kasutavad rakkudesse sisenemiseks enamasti endotsütoosi radu: makropinotsütoosi, klatriin-sõltuvat, kaveoliin-sõltuvat ja klatriin ning kaveoliin-sõltumatut endotsütoosi (Patel et al., 2007)(Stewart et al., 2008)(Vasconcelos et al., 2013). Endotsütoosi liigid on toodud joonisel 1.



Joonis 1 Endotsütoosi liigid. Endotsütoos on metaboolsest energiast sõltuv transpordimeetod, mille abil sisenevad rakku makromolekulid ja mittelahustuvad ained. (Mayor and Pagano, 2007)

1.2.2 Translokatsioon

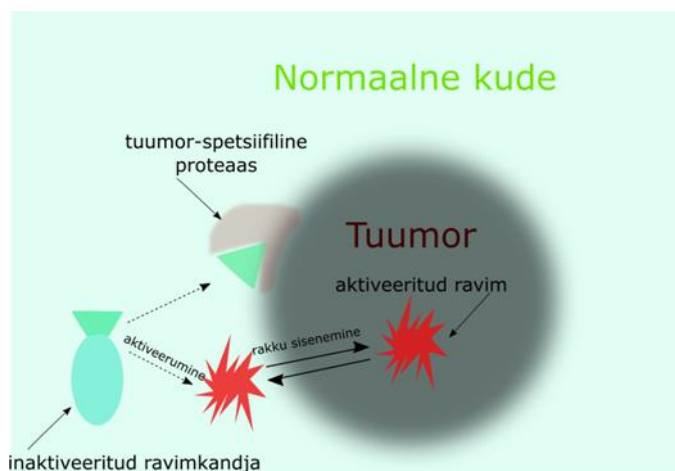
Translokatsioon ehk otsene penetreerumine on üks RSP-de rakkusisenemise rada, millega võivad siseneda enamasti väikese lastmolekuliga või lastita RSP-d. Translokatsiooni nimetatakse ka passiivseks rakku sisenemise rajaks, sest ta ei vaja rakku sisenemisel metaboolset energiat, vaid sõltub raku membraani läbilaskvusest. Translokatsiooni täpne mehhanism ei ole teada ning selle uurimiseks on loodud ja testitud mitmeid mudeleid. Peamised pakutud mudelid on hüdrofiilsete membraanipooride moodustamine, pööratud mitselli mudel, membraani häirimise mudel ning *carpet* mudel (Trabulo et al., 2010). Kõikide eelnimetatud mehhanismide puhul on esimeseks sammuks positiivselt laetud RSP-de interakteerumine negatiivselt laetud membraani komponentidega, millele järgneb membraani läbimine ja RSP-de vabastamine tsütosooli. Üldiselt arvatakse, et otsene penetratsioon toimub kõige tõenäolisemalt kõrgetel RSP-de kontsentratsioonidel ja pigem primaarsete amfipaatsete RSP-de puhul nagu näiteks transportaani analoogid (Madani et al., 2011).

1.3 Aktiveeritavad ravimikandjad

Kemoteraapia kasutamise põhiprobleem on suhteliselt madal selektiivsus kasvajakakkude suhtes, mis kõrvalmõjuna põhjustab toksilisust ka normaalsetele kudedele ja organitele. Nimetatud puuduse ületamiseks on üheks strateegiaks kasutada koos ravimiga aktiveeritavaid ravimikandjaid. Aktiveeritavad ravimikandjad on konstruktid, millel on puudulik või vähene farmakoloogiline aktiivsus kuni teatud tingimuste muutumiseni, mil nad läbivad biotransformatsiooni ning muutuvad terapeutiliselt aktiivseteks. (Leriche et al., 2012) (Joonis 2). Kandja kasutamise mõte on tagada terapeutiliste ravimite transport sihtmärk-kudedeni ning vähendada kahjulikke ravimi kõrvalmõjusid tervetele kudedele. Aktiveeritavad ravimikandjad koosnevad tavaliselt kahest elemendist, milleks on aktiivne ravimimolekul ja ravimikandja. Need kaks osa on omavahel ühendatud läbi töödeldava linkeri. Eduka aktiveeritava ravimikandja arendamise puhul on oluline täpne kontroll ravimi biodistributsiooni, ravimi vabastamise mehhanismi ja toksilisuse üle. Seejuures omab kõige olulisemat tähtsust kahjustunud kudedest ning tuumoritest tulevatele signaalidele reageerimise spetsiifilisus.

Kahjustunud rakud ja koed ekspresseerivad unikaalseid pinnamarkereid ja valke. Neid on võimalik spetsiifiliste ligandinteraktsioonide või stiimulitel põhinevate mehhanismide läbi kasutada sihtmärgina. Stiimulitel põhinevad vabastusmehhanismid on võimalik jagada veel omakorda kaheks: esiteks koesiseste stiimulite muutmisel põhinevad meetodid (näiteks pH muutus või ensüümide üleekspressioon) ja teiseks meetodid, mis põhinevad väliste stiimulite

kasutamisel (ultraheli, magnet, temperatuur, elektromagneetiline kiirgus) (Caldorera-Moore et al., 2010).



Joonis 2 Aktiveeritavate ravimikandjate aktivatsiooni mehhanism. Aktiveeritavad ravimikandjad on konstruktid, millel on puudulik või vähene farmakoloogiline aktiivsus kuni teatud tingimuste muutumiseni, mil nad läbivad biotransformatsiooni ning muutuvad aktiivseteks. Antud joonisel on toodud näitena ravimikandja, mis normaalses koes on inaktiveeritud olekus. Jõudes vähiraku lähedusse, toimub tuumor-spetsiifilise proteaasi abil inaktiveeriva domeeni eemaldamine ning ravimimolekul viiakse vähirakku. [<http://sackler.tufts.edu/Faculty-and-Research/Faculty-Research-Pages/William-Bachovchin>]

1.3.1 Aktiveeritavad rakku sisenevad peptiidid

RSP-de positiivseteks külgedeks loetakse nende väiksemat toksilist mõju erinevatele rakutüüpidele ning võimet transportida rakkudesse lisaks endale ka väga erineva suurusega biomolekule: pDNA-d, siRNA-d, oligonukleotiide, jne (Madani et al., 2011). RSP-de kasutamisel on üheks põhiliseks probleemiks nende rakuspetsiifilisuse puudumine (Vivès et al., 2008).

Eelnimetatud puuduse ületamiseks on uudseks strateegiaks potentsiaalsete terapeutiliste ravimite ja tumori kuvamiseks mõeldud molekulide rakkudesse toimetamisel aktiveeritavate rakku sisenevate peptiidide arendamine. Antud meetodi eeliseks on see, et peptiidiga seotud lastmolekul transporditakse peamiselt kahjustunud rakkudesse, minimaliseerides võimaluse, et ravim või fluorestseeruv markermolekul satuks rakkudesse, kus nad pole vajalikud või omaks pigem kahjulikku mõju.

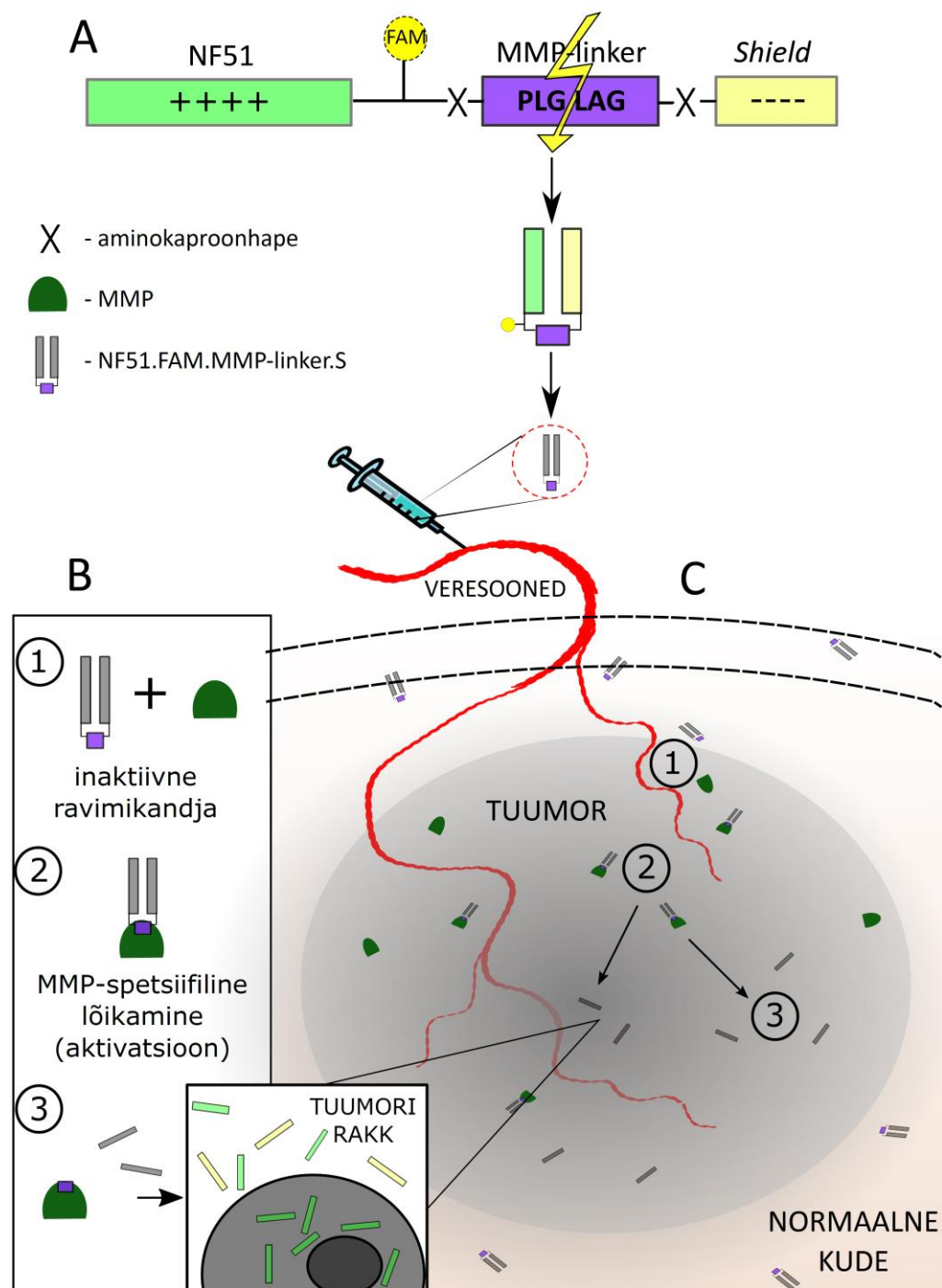
Aktiveeritav rakku sisenev peptiid on peptiidne järjestus, mille rakku sisenemine on takistatud blokeeriva elemendi tõttu ja peptiid koos lastmolekuliga ei saa rakku penetreeruda ning oma

eesmärki täita enne, kui toimub peptiidi aktiveerimine. Aktiveerimine võib toimuda teatud tingimuste muutmisel, olgu selleks kas: pH, temperatuuri, valgusintensiivsuse muutus või töötlemine spetsiifiliste protaasidega.

Hanseni grupp on kirjeldanud UV-aktiveeritavaid RSP-sid. Tehtud töös näidatakse, kuidas rakku sisenev peptiid, mida kasutatakse liposoomide rakku toimetamiseks on deaktiveeritud keemilise modifikatsiooni abil ning aktiveeritakse pärast UV-kiirgusega töötlust. Seeläbi vabaneb peptiid modifikatsioonist ja on võimeline transportima liposoomi rakkudesse. RSP-na kasutati Tat-peptiidi, mis liideti PEG-iga ning omakorda seoti liposoomi pinnale kahe lipiidse ankruga, millest ühte sai lõigata UV valgusega, mille tagajärjel Tat-peptiid paljastus ning aitas kaasa liposoomi rakku sisenemisele (Hansen et al., 2012).

Qian et al., 2012 aasta artiklis on kirjeldatud pH-aktiveeritavaid RSP-sid. Teatud ravimikandjad vabastavad ravimimolekulid ainult spetsiifilises pH vahemikus. Selle saavutamiseks kasutatakse näiteks pH-sõltuvaid linkereid. Tervete kudede puhul loetakse normaalseks pH tasemeks 7,4. Tuumorite rakuväline pH tase on üldiselt tervete rakkude pH-st happelisem, omades keskmist väärtust pH 6,8 (Qian et al., 2012).

2004. aastal avaldas Roger Tsieni grupp töö, milles näidati positiivselt laetud peptiidi rakkudesse mitte-sisenemist, kui see oli seotud negatiivselt laetud peptiidse järjestusega. Töös kasutati RSP-na polüarginiini, mille rakku sisenemine oli inhibeeritud negatiivselt laetud polüglutamiinhappelise järjestusega. Polüarginiin ja polüglutamiinhappelised järjestused olid omavahel seotud linkeriga, milleks oli MMP2 ensüümi poolt äratuntav ja lõigatav järjestus (Jiang et al., 2004). Antud järjestus valiti, kuna MMP2 ja MMP9 on proteaasid, millele on omane üleekspressioon kasvajakudedes. MMP-de üleekspressioon tagab tuumori-spetsiifilisuse. Normaalses kudedes jääb linker-järjestus puutumata. Õigeid proteaase ekspresseeriva tuumori puhul toimub antud vahelüli lõikamine ja blokeeritud peptiidi vabastamine (StephenR Adams and RogerY Tsien, 2006). Pärast MMP2 ensüümiga töötlemist ning inhibeeriva peptiidse järjestuse eemaldamist näidati RSP ning sellega seotud lastmolekuli rakku sisenemise efektiivsuse taastumist (Jiang et al., 2004) (Joonis 3).



Joonis 4 Disainitud NF51 analoogi NF51.FAM.MMP-linker.S skeem ning selle hüpoteetiline aktiveerimine tuumor-spetsiifilise MMP2 ensüümiga. A) NF51.FAM.MMP-linker.S skeem B) Disainitud konstrukti aktiveerimise teoreetilised etapid C) *in vivo* põhimõte. Süstides veresoontesse ringlevad inaktiveeritud ravimikandjad organismis ringi. Jõudes vähikoe lähedusse, kus ekspresseeritakse suuremas koguses MMP ensüümi, toimub inaktiveeritud ravimikandja töötlemine proteaasiga ja seeläbi ravimi aktiveerimine.

1.4 Transportaanist NF51-ni

NickFect-id (NF) on uudne rakku sisenevate peptiidide perekond, mis on disainitud parandamaks eelkõige peptiidi või peptiid:last kompleksi vabanemist endosoomidest ning RSP-de kui kandjamolekulide omadusi (Arukuusk et al., 2013). NF-d on väljatöötatud esimesest PepFect perekonda kuuluvast peptiidist, PepFect3-st (PF3). PF3-e näol on tegemist Transportaan10 (TP10) analoogiga, millele on N-terminaalsesse otsa lisatud stearüülhappejääk. On näidatud, et stearüülhappe lisamine soodustab peptiidi hüdrofoobseid interaktsioone membraanidega, tagades selle parema liikumise läbi plasmamembraani, aidates kaasa peptiidi:oligonukleotiidi transfektsiooni efektiivsusele ja endosomaalsele vabanemisele (Mäe et al., 2009). Võrreldes PF3-ga on NF51-e järjestuses läbi viidud modifikatsioon seitsmendas positsioonis oleva lüsiiniga. See on neuropeptiid galaniini ja mastoparaani jäägi vaheline linker. Lüsiin on asendatud ornitiiniga. Seejuures liideti kuuendas positsioonis olev glütsiin ornitiini kõrvalahela aminorühmaga (γ -NH₂) (Tabel 1). Võrreldes stearüül-TP10-ga, moodustab NF51 peptiid nukleiinhapetega stabiilsemaid väikseid nanopartikleid (62-160 nm), mis omavad suuremat transfektsiooni efektiivsust (Arukuusk et al., 2013).

Tabel 1 NickFect51 (NF51) väljakujunemine Transportaanist. (Mäe et al., 2009)(Arukuusk et al., 2013)

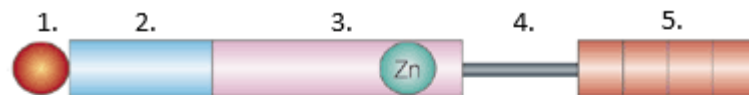
| PEPTIID | LÜHEND | JÄRJESTUS |
|----------------|--------|--|
| Transportaan | TP | GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂ |
| Transportaan10 | TP10 | AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂ |
| PepFect3 | PF3 | stearüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂ |
| NickFect51 | NF51 | stearüül-AGYLLG-NH $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ H ₂ N-CH-C-INLKALAALAKKIL-NH ₂ \parallel O |

1.5 Maatriksi metalloproteaasid

Proteaasid jagunevad aminohappeliste jääkide ja katalüüsiks vajalike kofaktorite alusel nelja suurde rühma: seriini proteaasid, tsüsteiiniproteaasid, aspartaadi proteaasid ja metalloproteaasid. Maatriksi metalloproteaasid (MMP-d) on ekstratsellulaarsete proteaaside perekonda kuuluvad proteolüütilised ensüümid- endopeptidaasid, mis on võimelised lagundama mitmeid erinevaid valke (Sekton, 2010). MMP perekonna proteaasid osalevad pidevas ekstratsellulaarse maatriksi ümberkorraldamises ja seeläbi paljude füsioloogiliste ja arenguliste protsesside reguleerimises nagu morfogeneesis, angiogeneesis või normaalses haava paranemise etappides (Vu and Werb, 2000). MMP-sid ekspresseerivad erinevaid rakutüübid nagu eptelirakud, fibroblastid ja põletikuga seotud rakud (Stetler-Stevenson, 1999).

Esimene märg MMP-de kohta pärineb aastast 1962, mil Gross ja Lapiere jälgisid härgkonna (*Rana catesbeiana*) kullese saba metamorfoosi ajal aset leidvaid ensümaatilise aktiivsuse muutusi. Nad asetasid kullese saba kollageenigeeli sisaldavale plaadile ja jälgisid geeli lagundamist kullese koetüki ümber. Isegi siis, kui kude oli asetatud filtrile ning otsene kontakt geeliga puudus, toimus geeli lagundamine. Sellega näitasid nad, et toimus kollageeni lõhustumist kollageenipeptiidideks (Gross and Lapiere, 1962).

MMP-d kuuluvad Zn^{2+} - sõltuvate metalloproteaaside perekonda. MMP-sid on võimalik jaotada nende struktuuri ja substraadispetsiifilisuse alusel kuude alarühma: kollageenaasid, gelatinaasid, stromelüsiinid, matrilüsiinid, membraanitüüpi MMP-d ja teised MMP-d (Vihinen and Kähäri, 2002). Põhilised MMP-de struktuursed üksused on: signaalpeptiidi domeen, mis suunab ensüümi sünteesimise käigus karedapinnalisse endoplasmaatilisse retiikulumi; propeptiidi domeen, mis säilitab ensüümi latentsust; katalüütiline domeen, kus asub väga konserveerunud Zn^{2+} seondumise regioon mis on vastutav ensüümi aktiivsuse eest; hemopeksiini domeen, mis määrab MMP substraadi spetsiifilisuse ning liigend, mis vahendab infot substraadi kohta katalüütilisele domeenile (Roy et al., 2009) (Joonis 5).



1. Signaalpeptiidi domeen
2. Propeptiidi domeen
3. Katalüütiline domeen
4. Liigend regioon
5. Hemopeksiini domeen

Joonis 5 MMP struktuursed üksused (Roy et al., 2009)

Peamine põhjus, miks maatriksi metalloproteaase uuritakse, on nende seotus vähkkasvajatega. Nad on võimelised lagundama rakku ümbritsevat ekstratsellulaarset maatriksit põhjustades nii patoloogiliste protsesside süvenemist. On näidatud, et nende aktiivsus mängib olulist rolli tuumorite kasvamisel, arenemisel ja metastaaside tekkel (Gialeli et al., 2011). Eelkõige seostatakse tuumoritega seotud sündmustega MMP2-te. See on 72kDa suurune MMP-de perekonnas gelatinaaside hulka kuuluv ensüüm, mida inimestes kodeerib MMP2 geen.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud magistritöö eesmärkideks on:

1. Jälgida, kuidas toimib lastmolekuli (fluorestseeruva märgise) rakku transport valitaks osutunud, varem väljatöötatud RSP-ga (NF51).
2. Disainida erinevad aktiveeritavad RSP analoogid, mis sisaldavad lisaks RSP järjestusele inaktiveerivat domeeni ning vähispetsiifilist aktiveerivat domeeni.
3. Sünteesida Fmoc tahke faasi peptidisünteesi meetodiga disainitud aktiveeritavad peptiidid.
4. Valideerida rakukultuuris inaktiveeriva domeeni mõju.
5. Valideerida vähispetsiifilise maatriksi metalloproteinaasi (MMP2) aktiveerivat toimet fluorestseeruva märgise rakku transpordil RSP-ga.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Peptiidide süntees

2.2.1.1 Peptiidide sünteesi meetodid

Töös käsitletud rakku sisenevad peptiidsed järjestused sünteesiti Fmoc/tBu tahke faasi peptiidi sünteesi meetodil kas käsitsi või automatiseeritud peptidisüntesaatorit (Biotage Initiator+Alstra Automated Microwave Peptide Synthesizer, Rootsi) kasutades. Süntees toimus C-terminusest N-terminuse suunas. Peptiidi valmistamisel kasutati tahke kandjana 250 mg 0,41 mmol/g *Fmoc-Rink Amide MBHA* vaiku (OPC Orpegen, Saksamaa) või 212 mg 0,41 mmol/g *Rink Amide ChemMatrix* vaiku (Biotage, Rootsi). Sünteesi skaala oli 0,1 mmol. Kõiki aminohappeid (AH) lisati 5x või 10x ülehulgas ja sidumise aeg sõltus kasutatud aminohappest, vajadusel korrati sama aminohappe sidumist. Fmoc katserühma eemaldamiseks kasutati 20% piperidiini lahust DMF-is (dimetüülformamiid). Aminohappe liitmisel kasutati nende aktiveerimiseks 0,5M HOBt-i (1-hüdoksübensotriasool) lahust DMF-is, 0,5M HBTU (N-[1H-Bensotriasool-1-üül) (dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat) lahust DMF-is ja tertsiaarset amiini DIEA-d (N,N-diisopropüületüülamiin). Sünteesitud järjestusele lisati käsitsi peptiidi N-terminusse stearüülhape (Sigma Aldrich). Lastmolekulina rakkude transfektsiooni efektiivsuse jälgimiseks lisati peptiidile fluorestseeruv märkis – FAM (6-karboksüfluorestseiin). Selleks eemaldati lüsiinilt Mtt kaitserühm 0,1% TFA lahusega ning

seejärel seoti peptiidiga FAM fluorestsentsmolekul, kasutades aktivaatorina HOBt-i ja DIC-i (N,N'-diisopropüülkarbodimiid).

Peptiidi eemaldamiseks tahkelt kandjalt kasutati TFA/TIS/H₂O (95%, 2.5%, 2.5%) lahust. Inkubeeriti 4 tundi ja siis suruti lahus läbi filtriga süstla. Üleliigne TFA aurustati ning peptiidi lahustamiseks kasutati 5 ml mQ-d. Lahusele lisati 45 ml-t dietüületrit, et ekstraheerida lahustunud orgaanilised kõrvalühendid. Antud lahus asetati -80 °C juurde vesifaasi jäätumiseni. Eeter eemaldati ja saadud vesifaasis peptiid lüofiliseeriti üleöö ning seejärel puhastati, kasutades pöördfaasi-vedelikkromatograafiat (RP-HPLC) (Agilent Technologies, USA).

2.2.1.2 Peptiidide puhastamine RP-HPLC-ga

Sünteesitud peptiidid puhastati, kasutades pöördfaasi-vedelikkromatograafiat (*Reversed phase High-performance liquid chromatography*). Selle abil lahutatakse molekulid üksteisest vastavalt nende hüdrofoobsusele. RP-HPLC koosneb mittepolaarsest statsionaarsest faasist (0,1% TFA-d AcN-s) ja mõõdukalt polaarset mobiilset faasist (0,1% TFA-d mQ-s). Peptiid lahustati 20% AcN/mQ lahuses ning seejärel suruti kõrge rõhu all läbi C4 kolonni (Phenomenex Jupiter C4, 5 µm, 300 Å, 250x10 mm). AcN% (atseetonitriil) sisalduse suurendamine muudab vesi-TFA faasi vähem polaarset, millest tulenevalt väljuvad peptiidid kolonnist kasvava hüdrofoobsuse alusel ehk peptiidid, mis koosnevad rohkematest hüdrofiilsetest aminohappejääkidest tulevad välja enne, kui hüdrofoobseid aminohappejääke sisaldavad peptiidid. Kogutud fraktsioone kontrolliti mass-spektromeetriga (MALDI-TOF), et leida õige massiga produkti sisaldav fraktsioon.

2.2.1.3 Sünteesitud peptiidide analüüs MALDI-TOF meetodiga

MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) on väga võimas, kiire ja tundlik uurimismetood, mis võimaldab täpselt iseloomustada uuritavaid kõrgmolekulaarseid aineid. Peptiidi molekulmassi analüüsimiseks segati 0,5 µl uuritavat proovi samaväärse koguse maatriksiga spetsiaalsel plaadil (Bruker, Saksamaa). Maatriksina kasutati α-tsüaano-4-hüdroksükaneel hapet (CHCA), mis kaitseb proovi lagunemise eest ning absorbeerib UV valguse 337 nm lainepikkust ja muundab selle soojusenergiaks. Väike osa maatriksist soojeneb kiiresti ja aurustub koos uuritava prooviga. Seeläbi tekib ioniseeritud gaas, kus iga molekul kannab ühte või mitut positiivset laengut. Ioniseeritud peptiidid kiirendatakse elektriväljas ning nad liiguvad detektorini, mis detekteerib ning analüüsib uuritavate peptiidide massi.

2.2.1.4 Sünteesitud peptiidide analüüs UPLC meetodiga

NF51 analoogi NF51.FAM.MMP-linker.S anioonse inhibeeriva domeeni eemaldamist vähispetsiifilise aktivatsiooni domeeni lõikamise läbi näidati, kasutades ülikõrgsurve vedelikukromatograafiat (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*). Kokku segati 25 µl-t uuritavat peptiidilahust (kontsentratsiooniga 40 µM), millele lisati 4 µl-it kas mQ-d või MMP2 (*MMP2 Active Human Recombinant, CHO cells* 0,1 mg/ml, Merck Millipore, Saksamaa) ensüümi. Segu inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures ning seejärel sisestati proov masinasse, kus see voolutati läbi AcN/H₂O gradiendi.

2.2.2 Katsed rakkudega

2.2.2.1 Rakkude kultiveerimine

Antud töös kasutati CHO (hiina hamstri munasarja) rakke, mida kasvatati L-glutamiini sisaldavas F-12 Nut Mix Ham 1x (Life Technologies) söötmes. Söötmele lisati 10% FBS-i (veise looteserum, PAA Laboratories, Austria), 1.0 mmol/l naatriumpüruvaati (Sodium Pyruvate Solution 100 mM, PAA Laboratories, Austria), 0.1 mmol/l asendatavaid aminohappeid (MEM Non-Essential amino acids 100x, PAA Laboratories, Austria) ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomüsiini (Penicillin/Streptomycin 100x, PAA Laboratories, Austria). Rakke kasvatati 5% CO₂ sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris 37 °C kraadi juures. Rakke külvati ümber iga 3 päeva järel.

2.2.2.2 Konfokaalmikroskoopia

Konfokaalmikroskoopia (Zeiss LSM710) läbiviimiseks külvati 24 tundi enne katse algust rakud spetsiaalsetele 8-kaevulistele plaatidele (*Lab-Tek Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System* Thermo Fisher Scientific, USA) kontsentratsiooniga 40 000 (24 tunni katse) või 50 000 rakku (30min; 3, 6 tunni katse) 250 µl-s Ham's-i täissöötmes kaevu kohta. Rakke kultiveeriti 37°C juures 5% CO₂ tingimustega inkubaatoris. Katsed viidi läbi duplikaatidena. Enne katse algust pesti rakud PBS-iga ning seejärel värviti sinise elusrakkude kuvamiseks mõeldud tuumavärviga Hoechst 33342, lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml, millel lasti inkubeerida 5% CO₂ sisaldavas veeauruga küllastatud atmosfääris 37 °C kraadi juures 30 minutit. Seejärel eemaldati värvilahus rakkudelt, pesti PBS-iga ja asetati peale värske Ham's-i täissööde (250 µl-t negatiivsetele kontrollrakkudele ning 225 µl-t katserakkudega kaevudele).

Negatiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke ja positiivse kontrollina kasutati disainil aluseks võetud NF51 peptiidi, mis oli märgistatud FAM fluorestsentsmärgisega. 6-

karboksüfluorestseini on fluorestsentsmärgis, mida kasutatakse erinevate biomolekulide märgistamiseks. 6-FAM ergastuslainepikkus ning emissiooni lainepikkus on vastavalt 492/517 nm. Eksperimendiks vajalikud peptiidilahused segati kokku vesikeskkonnas. Rakkudele lisati 25 µl-t fluorestsentsmärgisega peptiidilahust otse söötmesse. Saavutati 4 µM-ne peptiidi lõppkontsentratsioon. Rakke inkubeeriti peptiidilahusega söötmes 30 minutit 37 °C juures, seejärel lahust eemaldati ning rakke pesti 3x PBS-iga ja neile lisati 250 µl-t Ham's-i söödet. MMP2 töötluse mõju hindamiseks eelinkubeeriti osadele kaevudele lisatavat peptiidilahust enne rakkudele lisamist 4 µl-i rekombinantse inimese MMP2 ensüümiga (Merck Millipore, Saksamaa) 30 minutit 37 °C juures. Ülesvõtted rakkudest tehti vastavalt 30 min, 3, 6 ning 24 tunni möödudes peptiidi rakkudele lisamise järel.

2.2.2.3 Läbivoolutsütomeetria

Fluorestsents-positiivsete rakkude osakaalu kvantitatiivseks määramiseks rakupopulatsioonis kasutati läbivoolutsütomeetria (FACS- *Fluorescence activated cell sorter*, fluorestsents-aktiveeritav rakkude sorteerija). Selleks külvati 24 tundi enne eksperimendi algust 50 000 CHO rakku 24-kaevuliste plaatidele 1 ml-s HAM's-i täissöötmes. Rakke kultiveeriti 37°C juures 5% CO₂ tingimustega inkubaatoris. Katsed viidi läbi tripikaatidena. Negatiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke ning positiivse kontrollina kasutati algupärast NF51 peptiidi, mis oli märgistatud FAM fluorestsentsmärgisega. Katse käigus lisati rakkudele kas FAM-iga märgistatud peptiidi, mida ei töödeldud MMP2 ensüümiga või FAM-iga märgistatud peptiidi, mida oli lisaks töödeldud enne rakkudele lisamist 30 minutit 37°C juures 4 µl-i MMP2 ensüümiga. Selleks, et vältida RSP seondumisest rakumembraaniga tulenevat valepositiivset signaali, pesti rakke kolm korda PBS-iga ning seejärel eraldati nad koekultuuri plaadi küljest, kasutades 0,25% trüpsiin-EDTA lahust (Invitrogen, Rootsi). Seejärel suspendeeriti rakke jääkülmas PBS-i lahuses, millele oli lisatud 2% FBS-i (veise looteseerum). Rakke hoiti kuni mõõtmiseni jääl, kuid mitte kauem kui 10 minutit. Fluorestsentsi intensiivsuse analüüsimiseks kasutati firma BD LSRII läbivoolutsütomeetrit (BD Biosciences) ning tarkvara FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg, Saksamaa).

2.2.3 Andmeanalüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 6.05 andmetöötlusprogrammi ning Microsoft Excelit. Diagrammil on toodud aritmeetilised keskmised nende standardveaga. Konfokaalmikroskoopia pilte töödeldi *Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011 ZEN 2012 blue edition*-iga.

3 TULEMUSED

3.1 NF51 analoogide süntees

Antud magistritöös disainiti ning seejärel sünteesiti Fmoc/tBu tahke faasi peptiidi sünteesi meetodil kas käsitsi või automatiseeritud peptiidsüntesaatoril NF51 analoogid, mis sisaldasid lisaks NF51-le inaktiveerivat anioonset domeeni ning vähispetsiifilist aktiveeritavat domeeni. Sünteesiti kolm NF51 analoogi, millele oli lisatud erinevad anioonsed peptiidsed järjestused, mis edaspidi kannavad nimetust *Shield* (S).

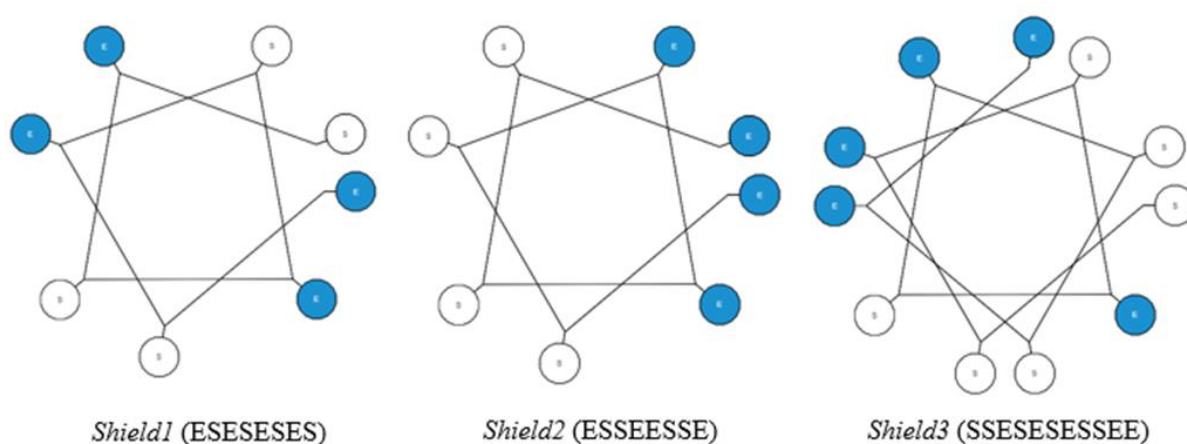
Peptiidide disainimisel arvestati ja võrreldi kahte kriteeriumit: negatiivse laenguga aminohapete hulka (S1 vs. S3) ning negatiivsete laengute paigutust (S1 vs. S2). Disainiti ja sünteesiti järgnevad järjestused:

Tabel 2 NF51 analoogid

| NF51 analoog | JÄRJESTUS |
|------------------------|---|
| NF51.FAM.MMP-linker.S1 | (stearüül-AGYLLG)δ-OINLKALAALAKKIL-K(FAM)-X-PLGLAG-X- ESESESES -NH ₂ |
| NF51.FAM.MMP-linker.S2 | (stearüül-AGYLLG)δ-OINLKALAALAKKIL-K(FAM)-X-PLGLAG-X- ESSEESSE -NH ₂ |
| NF51.FAM.MMP-linker.S3 | (stearüül-AGYLLG)δ-OINLKALAALAKKIL-K(FAM)-X-PLGLAG-X- SSESESESSEE -NH ₂ |

X- aminokaproonhape, **FAM-** fluorestsents märgis

Negatiivselt laetud AH-te paigutuse hindamiseks projekteeriti peptiidide sekundaarstruktuurid (Joonis 6).

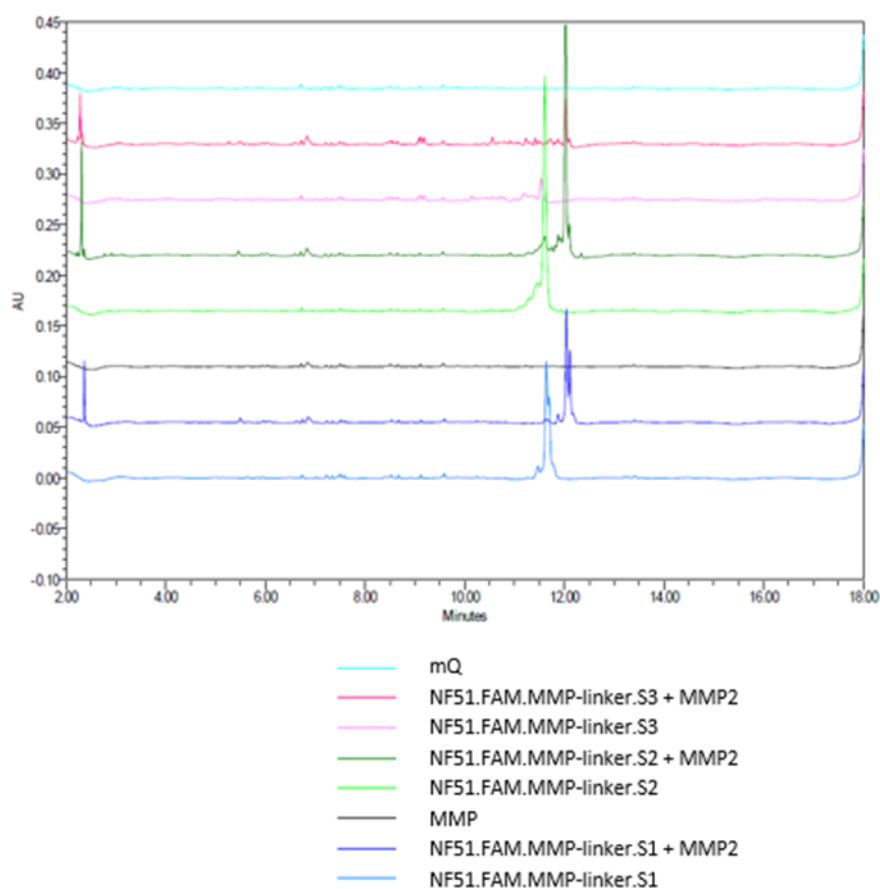


Joonis 6 *Shield*-ide projektsioonid. Sinised täpid on glutamiinhappejäägid. Valged täpid on seriini aminohappejäägid. [<http://kael.net/helical.htm>]

Peptiidid puhastati pöördfaasi-vedelikkromatograafia meetodiga (RP-HPLC) ja fraktsioonide õigsus kontrolliti mass-spektromeetriaga (MALDI-TOF). Mass-spektromeetria graafikud on toodud lisas (Lisa 1- Lisa 3).

3.2 MMP2 ensüümi mõju hindamine disainitud peptiididele UPLC meetodiga

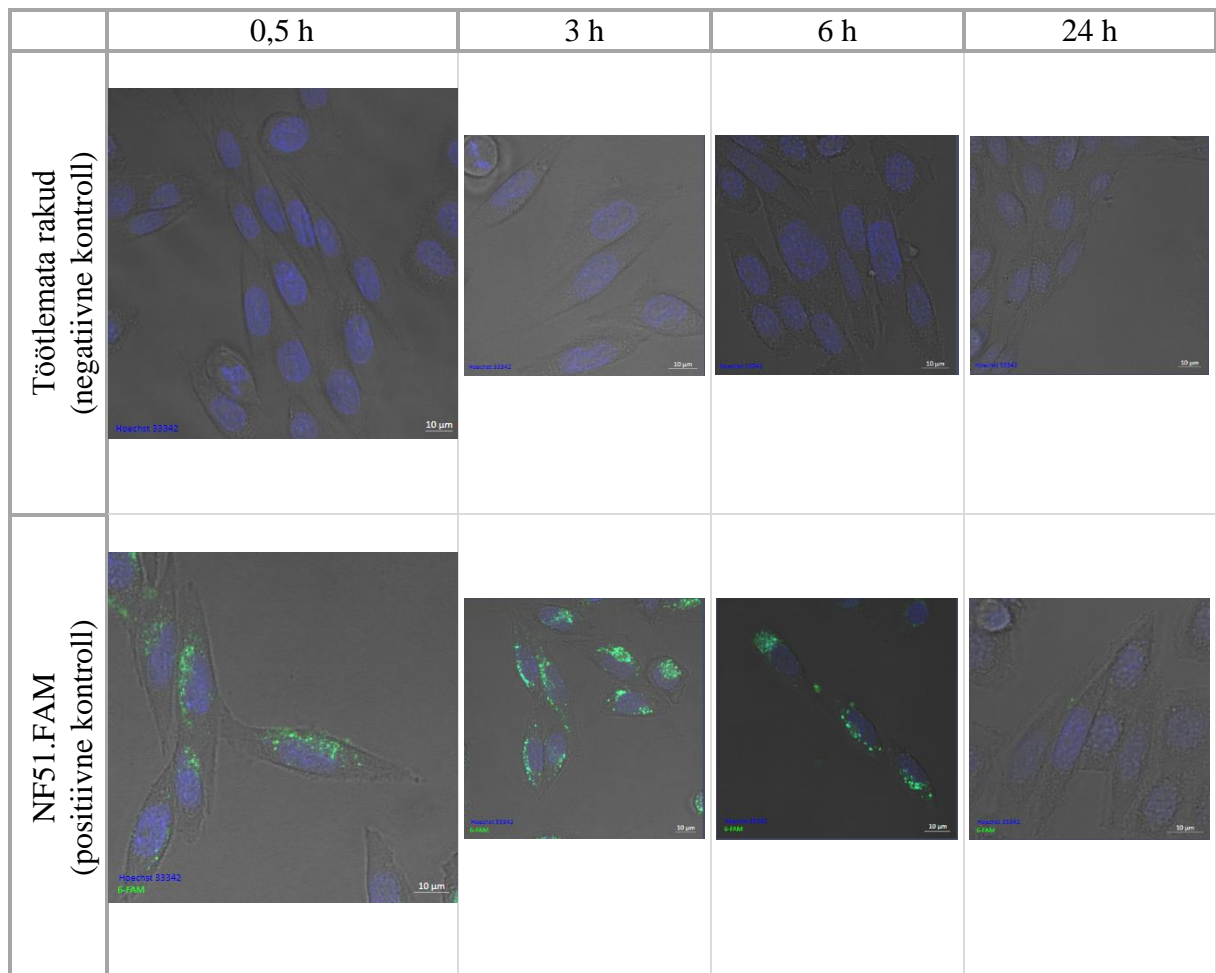
NF51.FAM.MMP-linker.S inaktiveeriva anioonse domeeni eemaldamist lõigates vähispetsiifilist domeeni MMP2 ensüümi-ga näidati, kasutades ülikõrgsurve vedeliku-kromatograafiat (UPLC) (Joonis 7).



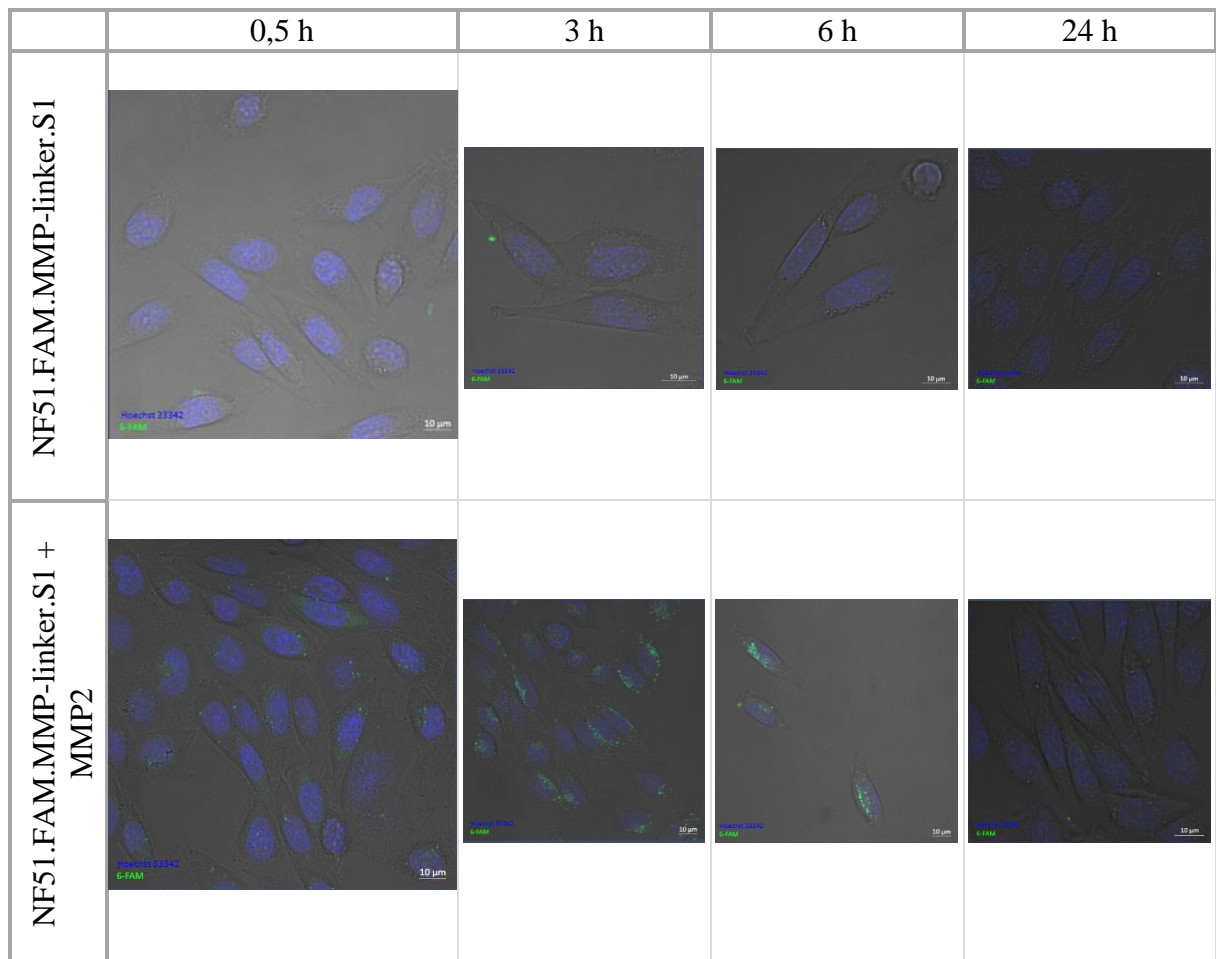
Joonis 7 Ülikõrgsurve vedeliku-kromatograafia diagramm. Diagrammil on näidatud MMP2 ensüümi võime lõigata NF51 analooge: NF51.FAM.MMP-linker.S1, NF51.FAM.MMP-linker.S2, NF51.FAM.MMP-linker.S3. See on näha lisapiigi tekkimisest proovides, kuhu on lisatud rekombinantset MMP2 ensüümi. MMP2 ensüümi proteaasne aktiivsus on näha kõigi kolme testitavate peptiidide puhul. Joonisel on kontrollidena toodud mQ-d ning ainult MMP2 ensüümi sisaldavad proovid.

3.3 FAM-i fluorestsents intensiivsuse hindamine, kasutades konfokaalmikroskoopiat

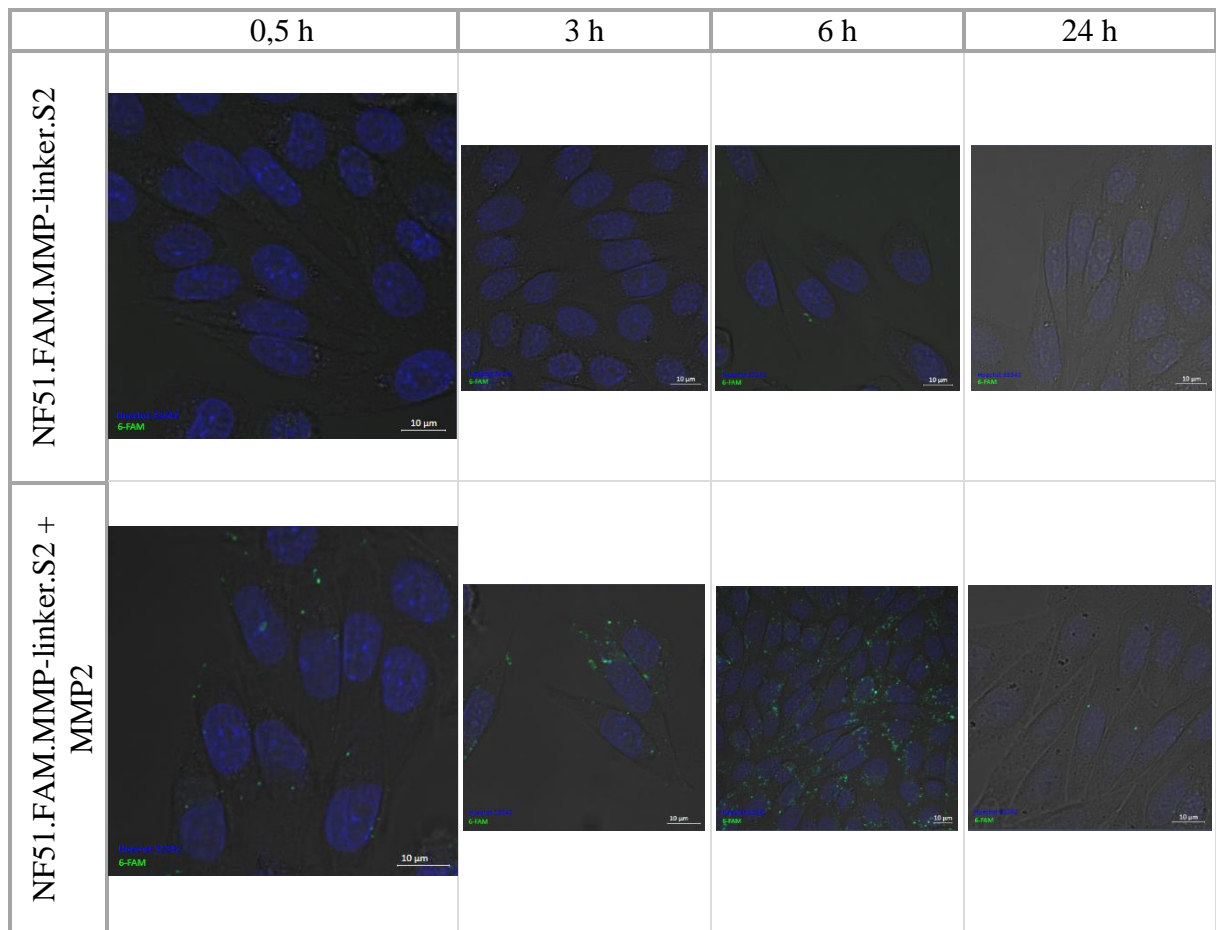
Fluorestseeruva FAM märgisega NF51 analooge, mis sisaldasid lisaks NF51-le rakku sisenemist inhibeerivat domeeni ning vähispetsiifilist aktiveeritavat domeeni analüüsiti kasutades konfokaalmikroskoopiat. Esmalt valideeriti disainil aluseks võetud NF51 rakku sisenemise efektiivsus (Joonis 8), millelt on näha rakku sisenemine juba 0,5 tunni möödudes. Aja möödudes muutus fluorestsentssignaali tugevus intensiivsemaks, saavutades maksimumi 6 tunni juures, kuid 24 tunni möödudes oli fluorestsentssignaal peaaegu olematu. Peptiidide toksilise mõju hindamiseks, vaadeldi rakke 24 tunni möödudes peptiidi rakkudele lisamise hetkest. Piltidelt on näha, et rakkude morfoloogia ei ole muutunud. MMP2 ensüümaktiveeritavuse valideerimiseks inkubeeriti NF51 analooge- NF51.FAM.MMP-linker.S1, NF51.FAM.MMP-linker.S2, NF51.FAM.MMP-linker.S3 enne rakkudele lisamist rekombinantse MMP2 ensüümiga ning võrreldi rakkudesse sisenemist ilma ensüümtöotluseta peptiididega. Esiteks võib öelda, et kõik 3 blokeerivad järjestust tõesti inhibeerisid fluorestseeruva märgise rakkudesse viimise (Joonis 9 – Joonis 11). Teisest küljest testiti, kas RSP aktiivsus on võimalik taastada MMP2 ensüümtöotlusest sõltuval moel. Tulemustest nähti, et blokeerivad järjestused olid MMP2-sõltuvalt eemaldatavad, sest kõikide konstruktide puhul oli ensüüminkubatsiooni järgselt tuvastatav peptiidi rakkudesse sisenemine.



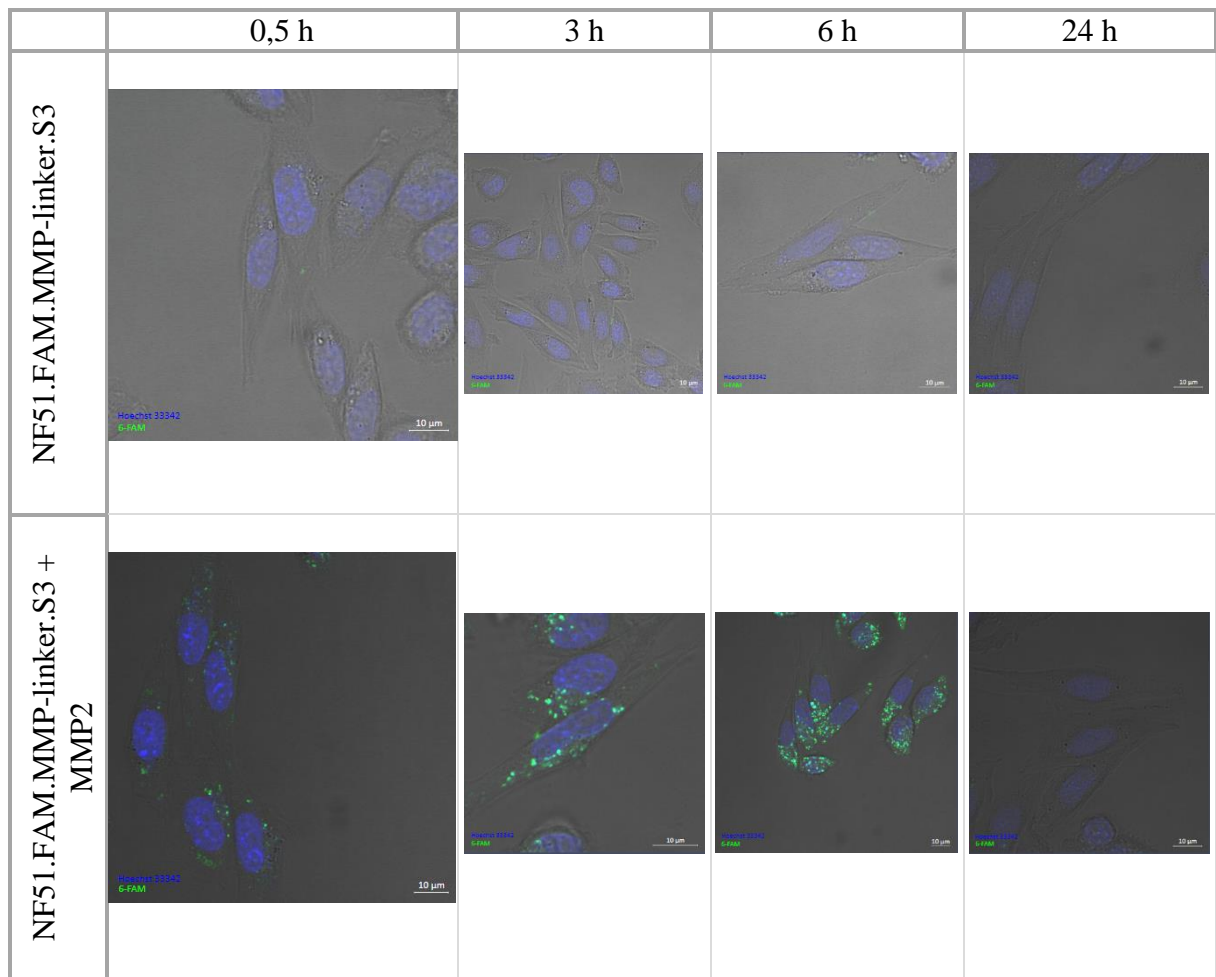
Joonis 8 Konfokaalmikroskoopia pildid töötlemata rakkudest ja NF51.FAM-i sisaldavatest rakkudest erinevatel ajapunktidel. Selgelt on näha FAM-iga märgistatud NF51 peptiidi sisenemist rakkudesse juba 0,5 h möödumisel peptiidi rakkudele lisamise hetkest. Peptiidilahuse lõppkontsentratsioon oli 4 μM . Mõõtjoon vastab piltidel 10 μm pikkusele alale.



Joonis 9 Konfokaalmikroskoopia pildid NF51.FAM.MMP-linker.S1 ja MMP2 ensüümiga töödeldud rakkudest erinevatel ajapunktidel. Selgelt on näha NF51.FAM.MMP-linker.S1 ensüümsõltuv sisenemine rakkudesse. MMP2-ga töödeldud rakkudes näeb fluorestsentsignaali juba 0,5 h möödumisel peptiidilahuse rakkudele lisamise hetkest. Samal ajal kui rakkudel, millele lisati NF51.FAM.MMP-linker.S1 ilma eelneva ensüümitöötluseta ei ole näha peptiidi sisenemist. Peptiidilahuse lõppkontsentratsioon oli 4 μ M. Mõõtjoon vastab piltidel 10 μ m pikkusele alale.



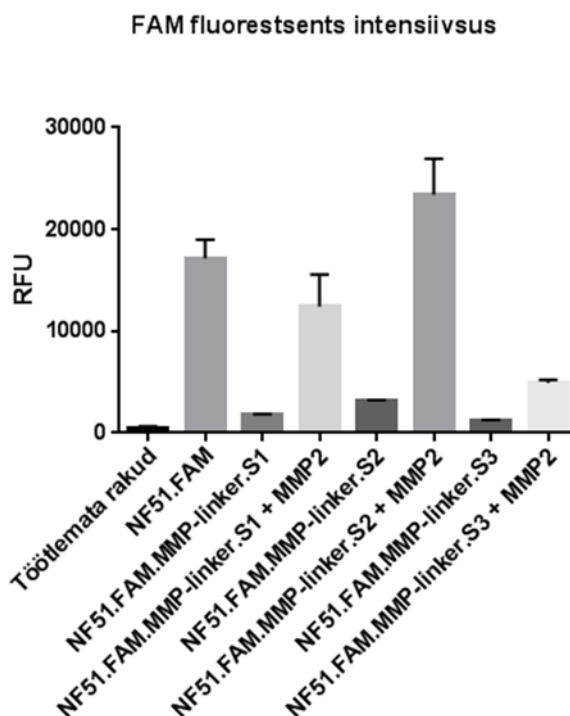
Joonis 10 Konfokaalmikroskoopia pildid NF51.FAM.MMP-linker.S2 rakkudest erinevatel ajapunktidel. Piltidelt ilmneb NF51.FAM.MMP-linker.S2 ensüümsõltuv sisenemine rakkudesse. MMP2-ga töödeldud peptiidi sisenemist rakkudesse on märgata juba 0,5 h möödumisel peptiidi rakkudele lisamise hetkest. Samal ajal kui rakkudel, millele lisati NF51.FAM.MMP-linker.S2 ilma eelneva ensüümitöötluseta ei ole näha peptiidi sisenemist. Peptiidilahuse lõppkontsentratsioon oli 4 μ M. Mõõtjoon vastab pildidel 10 μ m pikkusele alale.



Joonis 11 Konfokaalmikroskoopia pildid NF51.FAM.MMP-linker.S3 rakkudest erinevatel ajapunktidel. Piltidelt ilmneb NF51.FAM.MMP-linker.S3 ensüümsõltuv sisenemine rakkudesse. MMP2-ga töödeldud peptiidi sisenemist rakkudesse on märgata juba 0,5 h möödumisel peptiidi rakkudele lisamise hetkest. Samal ajal kui rakkudel, millele lisati NF51.FAM.MMP-linker.S3 ilma eelneva ensüümitöötluseta ei ole näha peptiidi sisenemist. Peptiidilahuse lõppkontsentratsioon oli 4 μ M. Mõõtjoon vastab piltidel 10 μ m pikkusele alale.

3.4 FAM-i fluorestsents intensiivsuse analüüs, kasutades läbivoolutsütomeetriat

Fluorestsents-positiivsete rakkude osakaalu kvantitatiivseks määramiseks CHO rakupopulatsioonis kasutati läbivoolutsütomeetriat. FACS-i andmed toetavad konfokaalmikroskoopia andmeid, kus on näha ensüümaktivatsiooni tagajärjel RSP rakku sisenemine. Kui võrrelda kvantitatiivselt, siis kõige efektiivsemat rakku sisenemist võis näha *Shield2* puhul. *Shield2* ja *Shield1* rakku sisenemiste tasemed on võrreldavad NF51-ga saadud tulemustega. *Shield3* rakku sisenemine jäi madalale tasemele. (Joonis 12) FACS-i pildid on toodud lisas (Lisa 4).



Joonis 12 FAM fluorestsentsi intensiivsus CHO rakkudel. Tulpdiagrammil on näidatud mõõdetud fluorestsentsi keskmine väärtus CHO rakupopulatsioonis. Katse viidi läbi triplikaatidena ning saadud tulemuste keskmiste põhjal koostati diagramm. Lävivoolutsütomeetria tulemustest ilmneb, et NF51 aktiveeritavate analoogide rakku sisenemise efektiivsus on blokeeritud, sest ensüümtöotluseta RSP-d ei ole võimelised rakku sisenema. MMP2 ensüümiga eeltöödeldud NF51.FAM.MMP-linker.S1 ja NF51.FAM.MMP-linker.S2 suudavad FAM-ga seotud RSP-d rakku siseneda NF51-ga võrreldaval tasemel. NF51.FAM.MMP-linker.S3 puhul on rakku sisenemine madal ka aktivatsiooni järel.

4 ARUTELU

Kemoteraapiat loetakse kõige perspektiivsemaks vähiravi meetodiks, sest erinevalt kirurgilisest sekkumisest ja kiiritusravist on ta võimeline jõudma kõikidesse vähirakkudesse. Kemoterapeutikumidel on omadus siseneda organismis kõikidesse rakkudesse, kaasaarvatud tervetesse kudedesse, seetõttu on vajalik arendada uusi meetodeid kemoterapeutikumide spetsiifilisemaks toimetamiseks kahjustunud rakkudesse. Suurt potentsiaali selle puuduse ületamiseks omavad aktiveeritavad ravimikandjad. Need on ühendid, millel puudub farmakoloogiline aktiivsus, kuni teatud tingimuste muutumiseni, mil nad läbivad biotransformatsiooni ning muutuvad terapeutiliselt aktiivseteks. Üheks potentsiaalseks ravimikandjaks võivad olla RSP-d, mis suudavad rakkudesse siseneda seejuures rakke kahjustamata. RSP-d on võimelised rakku transportima nendega kovalentselt või mitte-kovalentselt seotud erinevaid lastmolekule, mis iseseisvalt rakkudesse siseneda ei suuda.

Magistritöö raames oli eesmärgiks ühendada RSP-de potentsiaal ravimikandjatena ja aktiveeritavate ravimikandjate suund. Idee põhineb varasemalt tehtud Roger Tsieni grupi töö, milles näidati negatiivselt laetud polüglutamiinhappelise järjestusega seotud positiivselt laetud polüarginiini rakkudesse mitte-sisenemist. Inhabeeriva anioonse peptiidse järjestuse eemaldamisel tuumor-spetsiifilise ensüümiga, näidati RSP ning sellega seotud lastmolekuli rakkudesse sisenemise taastumist (Jiang et al., 2004). Erinevusi peptiidi disainis on käesoleva magistritööga mitmeid. Antud magistritöösse osutus valituks professor Langel grupi poolt juba varasemalt disainitud ning katsetatud NF51, mis on keerulisema struktuuriga kui polüarginiin ning sellega on näidatud häid endosomaalse vabanemise ja rakku sisenemise tulemusi (Arukuusk et al., 2013b). NF51 järjestuses ei asu positiivse laenguga aminohapped kõrvuti ja seetõttu disainiti uudsed NF51-te inaktiveerivad peptiidsed järjestused. Loodud anioonses järjestuses kasutati glutamiinhappejääkide hajutamiseks seriini. Lisaks kasutati paindliku linkerina aminokaproonhapet. Need linkerid võimaldavad kahe domeeni vahelist vaba liikumist. See suurendab võimalust, et positiivselt ja negatiivselt laetud domeenid saavad vabalt elektrostaatiliselt interakteeruda ning aitab kaasa peptiidi kokkuvoltumisele. Testimiseks kasutati esialgse lastmolekulina kasutati 22. positsioonis oleva lüsiini külge kinnitatud FAM fluorestsents märgist.

RSP aktiveeritavuse tagamiseks teostati kaks lisamodifikatsiooni. Esiteks lisati NF51 järjestusele inaktiveeriv domeen, mis püstitatud hüpoteeside kohaselt peaks laeng-laeng interaktsioonide tõttu blokeerima RSP aktiivsuse. Disainiti ja sünteesiti kolm NF51 analoogi, mis sisaldasid erinevaid inaktiveerivaid järjestusi, *Shield-e*. *Shield1-s* oli 4 negatiivse laenguga

aminohapet, mis vastasid 4-le positiivse laenguga aminohappele NF51 järjestuses. *Shield2*-s kasutati samuti nelja negatiivse laenguga aminohapet, kuid muudeti glutamiinhapete ja seriinide järjekorda. Glutamiinhapped paigutati peptiidi sekundaarstruktuuri kirjeldavas α -heeliksi mudelis ühele küljele (Joonis 6). *Shield3*-s suurendati negatiivsete laengute arvu ühe võrra.

Shield-de disainil oli eesmärgiks testida *Shield*-s sisalduvate negatiivsete aminohapete laengu arvu ja inhibitsiooni seost, kuna RSP-de aktiivsuse efektiivne inhibitsioon on aktiveeritava ravimikandja eelduseks. Lisaks laengute arvule võib inhibitsiooni efektiivsust mõjutada ka peptiidi sekundaarstruktuur ning laengute ruumiline paigutumine, mistõttu võib elektrostaatiline kontakt olla rohkem või vähem efektiivne. *Shield*-i hüpoteetilise α -heeliksi mudeli kujutamiseks kasutasime *helical wheel* programmi (Joonis 6). Sekundaarstruktuuri mudelist lähtuvalt sünteesiti veel üks peptiidne järjestus, mis sisaldas sama palju negatiivseid laenguid kui *Shield1* (sama aminohappeline koostis), aga millel oli teine negatiivsete laengute asukoht järjestuses.

Teise modifikatsioonina lisati MMP2 ensüümi lõikesait, mis asetseb RSP-i ja inaktiveeriva domeeni vahel. Hüpoteesi kohaselt peaks MMP2 ensüümiga töötlemise järgselt inaktiveeriv peptiidne järjestus ehk *Shield* RSP-st eemalduma ja selle tulemusena peaks NF51-e rakku sisenemise efektiivsus taastuma (Joonis 9 – 12).

Esmalt valideeriti disainitud RSP aktiveeritavust MMP2 ensüümiga ning kontrolliti, et ensüüm tõepoolest oleks võimeline konstrukti lõikama. Kasutades ülikõrgsurve vedelikukromatograafiat, näidati, et NF51 vabanes inaktiveerivast anioonsest peptiidsest järjestusest. Joonisel 7 on näidatud MMP2 ensüümi proteaasne aktiivsus kõikide kontrollitavate peptiidide puhul.

Selleks, et testida NF51 analoogide rakkudesse sisenemist, kasutati FAM märgisega ensüümtötluseta peptiide. Esiteks testiti kuidas mõjutab rakku sisenemise võimekust või selle puudumist erinev negatiivsete laengute arv *Shield* järjestuses. Omavahel võrreldi kahte järjestust: *Shield1* ja *Shield3*. Tehtud katsete puhul selgus, et mõlemad disainitud järjestused, olles kovalentselt NF51-ga seotud, inhibeerivad edukalt peptiidi rakkudesse sisenemise. Teiseks uuriti kuidas mõjutab rakku sisenemise võimekust või selle puudumist samaväärsete negatiivsete laengute arv, kuid erinev paigutus. Selleks võrreldi omavahel kahte järjestust: *Shield1* ja *Shield2*. Nii läbivoolutsütomeetria kui konfokaalmikroskoopia andmed näitasid, et mõlemad peptiidsed järjestused blokeerisid peptiidi rakkudesse sisenemise. Seega, hoolimata

laengute arvust või meie poolt testitud laengute paigutusest, olid kõik *Shield-id* võrdselt efektiivsed RSP aktiivsuse blokeerimisel.

NF51 analoogide töötlemise järel MMP2 ensüümiga, näitasid nii konfokaalmikroskoopia kui läbivoolutsütomeetria tulemused kõikide NF51 analoogide rakkudesse sisenemise efektiivsuse suurenemist juba 30 minuti möödumisel alates peptiidilahuse rakkudele lisamise hetkest. Fluorestsentssignaali tugevus muutus ajas intensiivsemaks, saavutades maksimumi 6 tunni järel. 24 tunni möödudes oli fluorestsentssignaal peaaegu olematu. See võib olla tingitud endosoomide küpsemisest hilisteks endosoomideks ning pH taseme langusest pH 5-6-ni. See põhjustab rohelise fluorestsentskiirguse vähenemist (Arukuusk et al., 2013a). Antud töös jälgiti ainult FAM-i paiknemist rakus ning seega ei saa hinnata RSP enda rakusisest saatust. RSP võib 24 tunni möödudes olla samuti metaboliseeritud.

Varieerides glutamiinhappejääkide arvu inhibeerivas domeenis (*Shield1* ja *Shield3*), ilmneb läbivoolutsütomeetria analüüsil, et *Shield1-te* sisaldanud peptiidi rakkudesse sisenemine on pärast MMP2 ensüümiga töötlust palju efektiivsem kui *Shield3-e* sisaldanud peptiidil. See võiks olla seotud tugevamate elektrostaatiliste tõmbejõududega, mis on tingitud ühest negatiivse laenguga lisaaminohappest *Shield3-s*. *Shield3-e* negatiivsete laengute tõttu võivad assotsiatsiooniga seotud jõud olla palju suuremad kui dissotsiatsioonijõud, mille tagajärjel ei eemaldu domeenid teineteisest täielikult ka ensüümtöötlemise järel. Katsetest võib järeldada, et 4 negatiivse laenguga aminohappe esinemine inhibeerivas anioonses peptiidis järjestuses on piisav selleks, et blokeerida RSP-de rakkudesse sisenemine.

Ensüümtöötlemise järel oli rakku sisenemise aktiivsus jälgitav nii *Shield1-te* kui ka *Shield2-te* sisaldanud NF51 analoogidel. *Shield2-te* sisaldanud järjestusega mõõdetud fluorestsentsi intensiivsus oli mõnevõrra suurem. *Shield1* ja *Shield2* on sama aminohappelise koostisega, kuid erinevad glutamiinhappejäägi paigutusest primaarstruktuuris (Tabel 2). Tulemustest võiks testitud andmete piires oletada, et laengute paigutamine *Shield-i* järjestuses ei mõjuta oluliselt ensüümtöötlemise järgset NF51 ja *Shield* domeenide dissotsiatsiooni.

Antud magistritöö raames disainiti MMP2 ensüümiga aktiveeritavad *Shield* järjestust sisaldavad NF51 analoogid. Esialgsete tulemuste põhjal on disainitud NF51 analoogide rakku sisenemine inhibeeritud, kuni eemaldatakse *Shield* järjestus tuumor-spetsiifilise proteaasiga. Aktivatsiooni järel on detekteeritav FAM märgise akumulatsioon rakus. Siiski, antud töös kasutatud meetodid ei võimalda teha järeldusi peptiidi aktivatsiooni efektiivsuse kohta keskkonnas, kus MMP2 ensüümi ekspresseritakse juba rakkude endi poolt. Rakukultuurid ei

ekspresseeri MMP2-te nii suures kontsentratsioonis, kui antud magistritöö puhul peptiidilahustele lisati. MMP2-te ekspresseeriv rakukultuuri mudel võimaldaks testida peptiidi aktivatsiooni bioloogiliselt relevantsemas süsteemis ning aitaks selgitada, kas rakkude enda poolt toodetud ja sekreteeritud MMP2-e kogused on piisavad, et tagada MMP2-st sõltuv RSP sisenemine rakkudesse. Eelpool püstitatud küsimusele vastamine on kindlasti aktiveeritavate RSP-de testimisel üks edasisi prioriteedisuundi.

Rakkudes ilmnes peptiidi ensüümiga töötlemise järel fluorestsentssignaal, mis oletatavasti tekkis NF51 analoogide järjestustes toimunud lõike tulemusena, kuid lõikamise protsessi, ajahetke ning domeenide saatust saadud tulemuste põhjal otseselt hinnata ei saa. Seetõttu on plaanis disainida uued NF51 analoogid, et neid testida FRET-ga (fluorestsentsresonants energia ülekande analüüsiga) (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). FRET seisneb fluorestsentsi mõõtmisel kahe fluorestsentsmärgisega, millest üks ergastab teist fluorofoori juhul kui nad paiknevad piisavalt lähestikku. Üks fluorofoor tuleb paigutada ühele poole MMP2 lõikesaiti ning teine teisele poole. MMP2 vahendatud lõikamise järel toimub positiivse laenguga ja negatiivse laenguga domeenide eraldumine teineteisest ning esimese fluorofoori ergastamisel on nähtav esimese fluorofoori emissioonisignaal. FRET-iga oleks teoreetiliselt võimalik hinnata nii lõikamisprotsessi efektiivsust, kui ka jälgida mõlema domeeni saatust rakus ja selle ümbruses.

Kokkuvõtteks, antud töös disainiti MMP2 ensüümist sõltuv aktiveeritav RSP, mida saab potentsiaalselt kasutada tuumori-spetsiifiliseks kuvamiseks või ravimite tuumorini toimetamiseks.

5 KOKKUVÕTE

Tänapäeval peetakse arenenud riikide elanikkonna seas vähki üheks suuremaks üldise suremuse põhjustajaks. Vähiravi jaguneb kolme klassi. Kirurgiline sekkumine ja kiiritusravi on mõlemad head meetodid vähiravis, kuid ei suuda tagada täielikku vähirakkude eemaldamist organismist. Kõige perspektiivikamaks meetodiks on kemoteraapia. Erinevalt eelnevalt nimetatud meetoditest on kemoterapeutikumid võimelised jõudma kõikidesse vähirakkudesse, kuid nad mõjutavad ka terveid kudesid. Seetõttu on mõistlik arendada uusi meetodeid kemoterapeutikumide spetsiifilisemaks toimetamiseks kahjustunud rakkudesse. Üheks võimaluseks on kasutada selleks aktiveeritavaid ravimikandjaid, mis ise ei oma vähivastast bioefekti, kuid mõjutavad ravimi farmakokineetikat.

RSP-del on potentsiaali olla edukas aktiveeritav ravimikandja, sest nad suudavad rakkudesse siseneda neid kahjustamata ning sinna transportida endaga seotud lastmolekule. RSP-de mitmete positiivsete omaduste kõrval on puuduseks madal koespetsiifilisus.

Antud magistritöösse valiti professor Langeli grupi poolt juba varasemalt disainitud ning testitud RSP NF51, millega on näidanud peptiidi efektiivset sisenemist rakkudesse. Selleks, et suurendada peptiidi koespetsiifilisust, lisati peptiidile inaktiveeriv peptiidne järjestus ja vähikoes üleekspresseeritava MMP2 ensüümi lõikesait.

Magistritöö eksperimentaalse osa eesmärkideks oli disainida ja sünteesida erinevad NF51 analoogid, mis sisaldasid lisaks NF51-le ka inaktiveerivat anioonset domeeni, vähispetsiifilist lõigatavat domeeni ja transfektsiooni efektiivsuse kontrollimiseks fluorestseeruvat märgist. Inaktiveeriva domeeni disain põhines negatiivselt laetud aminohapete lisamisel peptiidijärjestusse. Kasutades konfokaalmikroskoopiat ja läbivoolutsütomeetriat, testiti inaktiveeriva anioonse domeeni ning vähispetsiifilise aktiveeriva domeeni mõju fluorestseeruva märgise rakku transpordil.

Testiti kolme erinevat NF51 analoogi, mille disainimisel arvestati ja võrreldi kahte kriteeriumit: negatiivse laenguga aminohapete hulka ning negatiivsete laengute paigutust peptiidises järjestuses. Tulemustest võis järeldada, et kõik kolm disainitud ja sünteesitud NF51 analoogi, mis sisaldasid erinevaid inaktiveerivaid järjestusi, inhibeerisid edukalt peptiidi sisenemise rakkudesse. Disainitud peptiidide töötlemisel tuumorspetsiifilise proteaasiga- MMP2, taastus peptiidi rakku sisenemise efektiivsus.

Antud töös disainiti MMP2 ensüümiga aktiveeritav RSP, mida saab potentsiaalselt kasutada tuumori-spetsiifiliseks kuvamiseks või ravimite tuumorini toimetamiseks.

6 SUMMARY

NickFect51 analogs as potential tumor-specific activatable drug carriers

Evelin Rammul

Nowadays cancer is considered to be one of the most death causing diseases in developed countries. Cancer treatment is divided in three classes. Firstly surgical treatment and secondly radiation therapy which both are good treatment methods, but are unable to ensure complete removal of cancer cells from the organism. Third method, which is also considered to be most prospective, is chemotherapy. Chemotherapy-s advantage over previously mentioned methods is it`s ability to reach every cell of the body. Because it`s ability to enter every cells, including to healthy tissues, it is reasonable to develop new methods to make chemotherapy more specific. One way for this is to use prodrugs, which itself doesn`t have anti-cancer effect but they have ability to affect the pharmacokinetics of chemotherapy drugs.

Cell penetrating peptides have potential to be successful activatable drug carriers, because they have capacity to penetrate cells without damaging them. They can also be used to transport different cargos to cells. CPP-s have many advantages but one of the disadvantage is lack of tissue specificity.

In this Masters thesis, peptide NF51 that was formerly created and tested by professor Langel`s group, in Tartu, was chosen. NF51 has previously shown good transfection and endosomal escape results. To increase specificity of the peptides for tumor cells, some modifications in peptide sequences were made. Firstly, inactivating peptide sequence was added. Secondly, tumor-specific cleavable domain, that is recognized by MMP2, was added to peptides. MMP2 is an enzyme that is overexpressed in tumor cells.

Aim of this thesis was to disain and synthesize different NF51 analogs, that beside NF51 contained also fluorecence label, flexible linker, tumor-specific cleavable domain and inactivating anionic domain. Tumor-specific cleavable domain`s and inactivating anionic domain`s impact on transport of fluorecence label to cells were tested using confocal microscopy and FACS (*fluorescence activated cell sorter*).

Three different NF51 analogs were tested. They differed from one another by inactivatable anionic sequence. In peptide design, two criteria were taken into account: firstly the count of negatively charged amino acids in peptide sequence and secondly the placement of negatively charged amino acids in peptide sequence. Test results showed that all three designed and

synthesized NF51 analogs inhibited successfully penetration function of the peptide. After treating NF51 analogs with with tumor-specific protease, MMP2, inactivatable domain was removed and cell penetrating properties restored.

In current thesis MMP2 activatable aCPP was designed, that can potentially be used for tumor-specific imaging or drug delivery.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Arukuusk, P, Pärnaste, L, Margus, H, Eriksson, NKJ, Vasconcelos, L, Padari, K, Pooga, M, Langel, Ü. 2013a. Differential Endosomal Pathways for Radically Modified Peptide Vectors. *Bioconjug. Chem.* 24: 1721–1732.
- Arukuusk, P, Pärnaste, L, Oskolkov, N, Copolovici, D-M, Margus, H, Padari, K, Möll, K, Maslovskaja, J, Tegova, R, Kivi, G, Tover, A, Pooga, M, Ustav, M, Langel, Ü. 2013b. New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828: 1365–1373.
- Caldorera-Moore, M, Guimard, N, Shi, L, Roy, K. 2010. Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7: 479–495.
- Conner, SD, Schmid, SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37–44.
- Derossi, D, Joliot, AH, Chassaing, G, Prochiantz, A. 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 10444–10450.
- Dietz, GPH, Bähr, M. 2004. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol. Cell. Neurosci.* 27: 85–131.
- Erazo-Oliveras, A, Muthukrishnan, N, Baker, R, Wang, T-Y, Pellois, J-P. 2012. Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos: Strategies and Challenges. *Pharmaceuticals* 5: 1177–1209.
- Frankel, AD, Pabo, CO. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55: 1189–1193.
- Futaki, S, Suzuki, T, Ohashi, W, Yagami, T, Tanaka, S, Ueda, K, Sugiura, Y. 2001. Arginine-rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. *J. Biol. Chem.* 276: 5836–5840.
- Gialeli, C, Theocharis, AD, Karamanos, NK. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 278: 16–27.
- Green, M, Loewenstein, PM. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179–1188.
- Gross, J, Lapiere, CM. 1962. COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48: 1014–1022.
- Hansen, MB, van Gaal, E, Minten, I, Storm, G, van Hest, JCM, Löwik, DWPM. 2012. Constrained and UV-activatable cell-penetrating peptides for intracellular delivery of liposomes. *J. Controlled Release* 164: 87–94.

- Jiang, T, Olson, ES, Nguyen, QT, Roy, M, Jennings, PA, Tsien, RY. 2004. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 17867–17872.
- Joliot, A, Pernelle, C, Deagostini-Bazin, H, Prochiantz, A. 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 1864–1868.
- Leriche, G, Chisholm, L, Wagner, A. 2012. Cleavable linkers in chemical biology. *Bioorg. Med. Chem.* 20: 571–582.
- Madani, F, Lindberg, S, Langel, U, Futaki, S, Gr  n, Slund, A. 2011. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *J. Biophys.* 2011: e414729.
- M  e, M, EL Andaloussi, S, Lundin, P, Oskolkov, N, Johansson, HJ, Guterstam, P, Langel, U. 2009. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Controlled Release* 134: 221–227.
- M  e, M, Langel, U. 2006. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6: 509–514.
- Milletti, F. 2012a. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17: 850–860.
- Milletti, F. 2012b. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17: 850–860.
- Morris, MC, Deshayes, S, Heitz, F, Divita, G. 2008. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell* 100: 201–217.
- Patel, LN, Zaro, JL, Shen, W-C. 2007. Cell Penetrating Peptides: Intracellular Pathways and Pharmaceutical Perspectives. *Pharm. Res.* 24: 1977–1992.
- Di Pisa, M, Chassaing, G, Swiecicki, J-M. 2015. Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* 54: 194–207.
- Qian, W-Y, Sun, D-M, Zhu, R-R, Du, X-L, Liu, H, Wang, S-L. 2012. pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release. *Int. J. Nanomedicine* 7: 5781–5792.
- Roy, R, Yang, J, Moses, MA. 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27: 5287–5297.
- Sekton, B. 2010. Matrix metalloproteinases – an overview. *Res. Rep. Biol.*: 1.
- StephenR Adams, RogerY Tsien. 2006. Imaging the Influx of Cell-Penetrating Peptides into the Cytosol of Individual Live Cells. In: *Handbook of Cell-Penetrating Peptides, Second Edition Pharmacology and Toxicology: Basic and Clinical Aspects*. CRC Press, p 505–513.
- Stetler-Stevenson, WG. 1999. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* 103: 1237–1241.

- Stewart, KM, Horton, KL, Kelley, SO. 2008. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org. Biomol. Chem.* 6: 2242–2255.
- Trabulo, S, Cardoso, AL, Mano, M, De Lima, MCP. 2010. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 3: 961–993.
- UK, CR. 2015. Liposomal doxorubicin (Caelyx, Myocet, Doxil).
- Vasconcelos, L, Pärn, K, Langel, Ü. 2013. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. *Ther. Deliv.* 4: 573–591.
- Vihinen, P, Kähäri, V-M. 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 99: 157–166.
- Vivès, E, Schmidt, J, Pèlegri, A. 2008. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1786: 126–138.
- Vu, TH, Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14: 2123–2133.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Joonis 6 <http://kael.net/helical.htm>

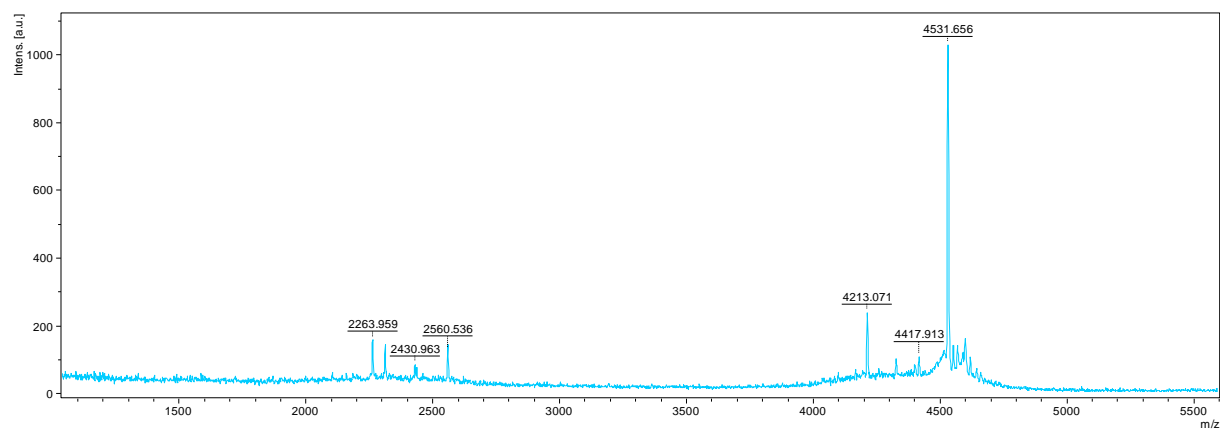
Joonis 2 <http://sackler.tufts.edu/Faculty-and-Research/Faculty-Research-Pages/William-Bachovchin>

LISAD

Sünteesiproduktide MALDI-TOF massispektrid pärast puhastamist.

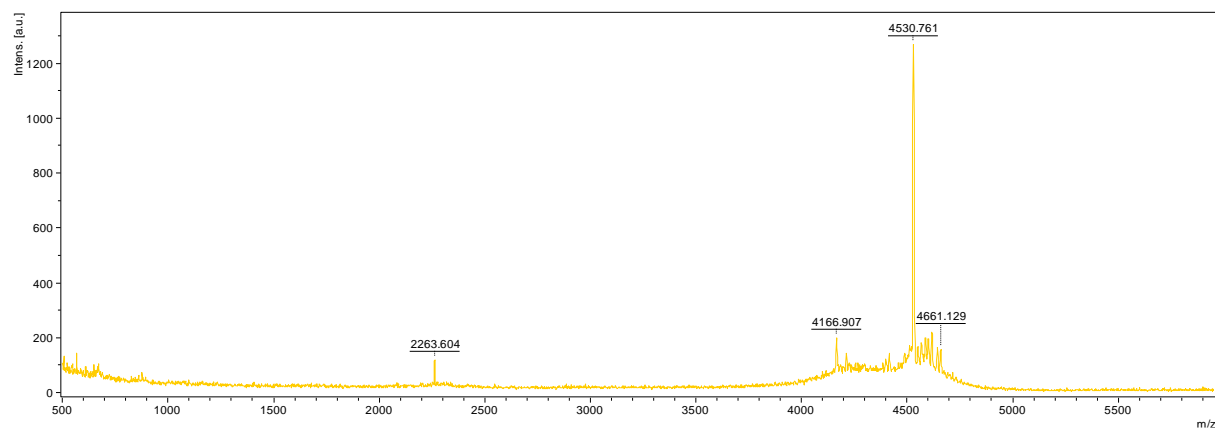
LISA 1

NF51.FAM.MMP-linker.*Shield1*



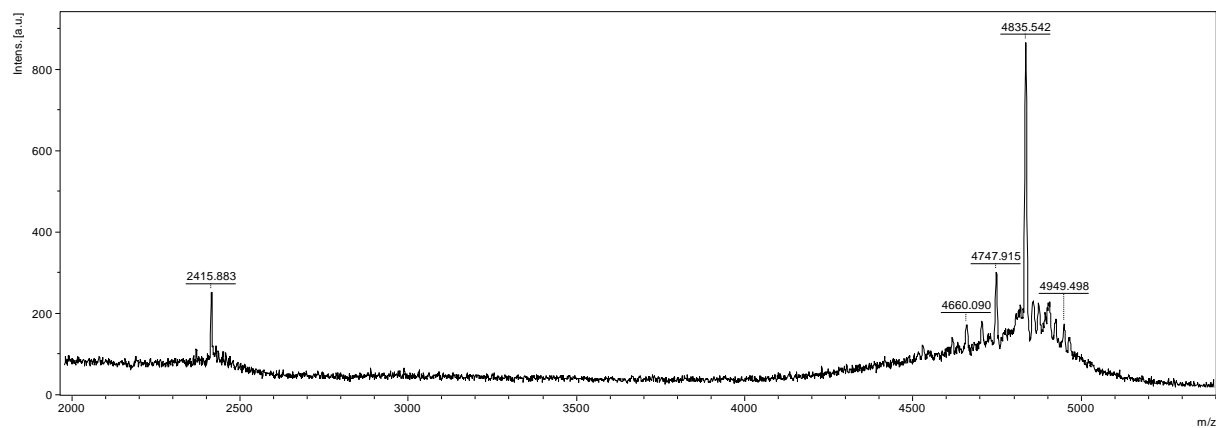
LISA 2

NF51.FAM.MMP-linker.*Shield2*



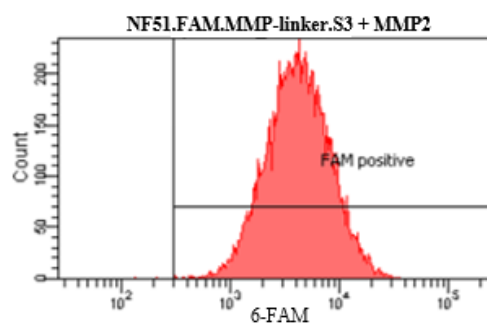
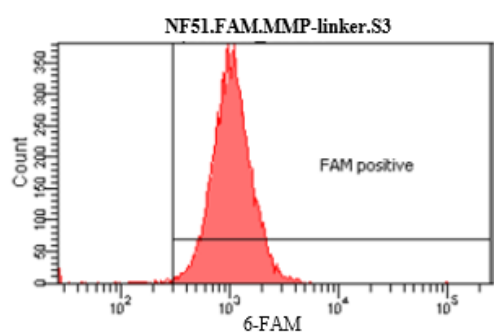
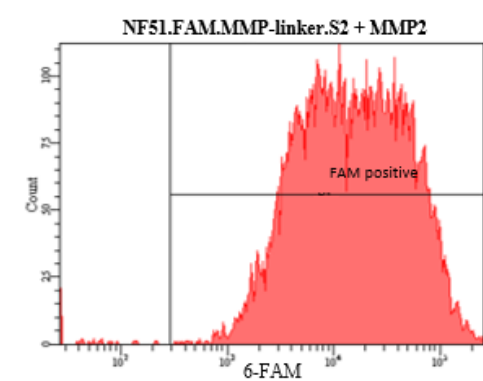
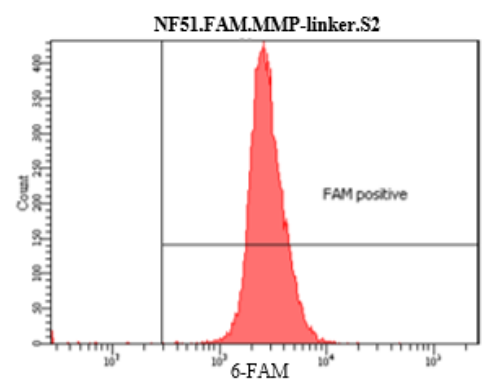
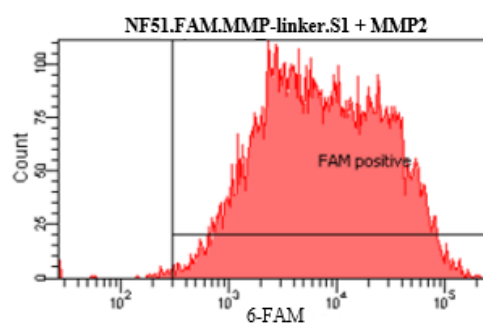
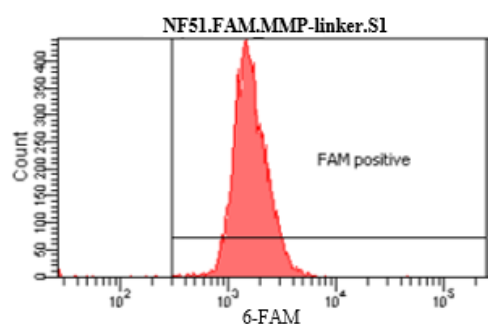
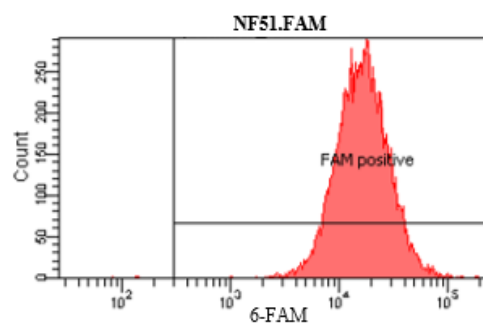
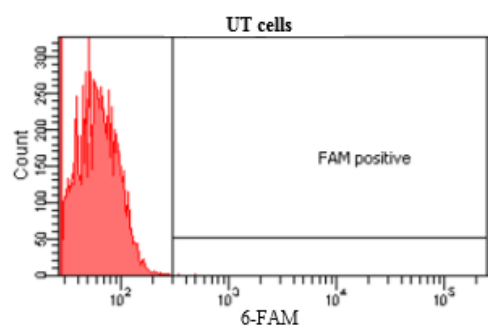
LISA 3

NF51.FAM.MMP-linker.*Shield3*



LISA 4

Läbivoolutsütomeetria pildid



TÄNUSÕNAD

Suured tänud juhendajatele Kaido Kurrikoff ja Piret Arukuusk meisterliku juhendamise, kannatlikkuse ja hea nõu eest.

Erilised tänud veel Ly Pärnastele vastutulelikkuse, praktiliste nõuannete, kulutatud aja ja energia ning tuhandete asjalike märkuste eest, mis aitasid kaasa antud magistritöö valmimisele.

Lisaks tänan kogu meie uurimisgruppi abivalmiduse ja meeldiva töökeskkonna loomise eest, eriti tänan Kristina Kiisholtsi vajalikel hetkedel motiveerivate sõnade eest.

Aitäh Eve Toomsoole konfokaalmikroskoopiat ja FACS-i puudutavate konsultatsioonide eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Evelin Rammul

(sünnikuupäev: 19.09.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„NickFect51 analoogid kui potentsiaalsed tuumori-spetsiifilised aktiveeritavad ravimikandjad“, mille juhendaja on Kaido Kurrikoff ja Piret Arukuusk,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **06.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015